The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

ÜBER DIE KLEIENPHOSPHOESTERASE.

Erste Mitteilung.

Von

SHUICHI UZAWA.

(*Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.*)

(Eingegangen am 20. August 1931)

Die Fermente, welche aus Phosphorverbindungen anorganischen Phosphor abspalten, wurden bisher im allgemeinen Phosphatase genannt. Man hat früher angenommen, dass ein einheitliches Ferment für die Hydrolyse der verschiedenen Phosphorverbindungen hinreichend sei, und die Pyrophosphathydrolyse wurde ebenfalls der Wirkung desselben Ferments zugeschrieben. Im hiesigen Institut wurde dann die Differenzierung der Phosphatase unternommen. Die Experimente sind noch im Gange. Die bisher erzielten Ergebnisse zeigen, dass das Phosphorsäureester spaltende Ferment von dem pyrophosphatspaltenden abgesondert werden muss. Meinem Kollegen Kurata(1931) gelang die scharfe Trennung der beiden Fermente, und er hat die Benennung Phosphoesterase für das erste Ferment und Pyrophosphatase für das zweite vorgeschlagen.

Durch die fortgesetzten Untersuchungen auf diesem Gebiet wurde festgestellt, dass die Phosphoesterase, die auf Phosphorsäureester wirkt, wieder in 2 Arten eingeteilt werden muss, nämlich in Mono- und Diesterase. Die Monoesterase spaltet, wie ihre Benennung kennzeichnet, verschiedene Arten von Phosphorsäuremonoester. Die Diesterase greift Phosphorsäurediester an und zerlegt ihn in ein Molekül Phosphorsäuremonoester und ein Molekül Alkohol. Diester können also erst durch Mitwirkung der Di- und Monoesterasen vollständig in ihre Komponenten aufgespalten werden. Über die Phosphodiesterase wird vom Verfasser in der nächst anschliessenden Mitteilung berichtet werden.

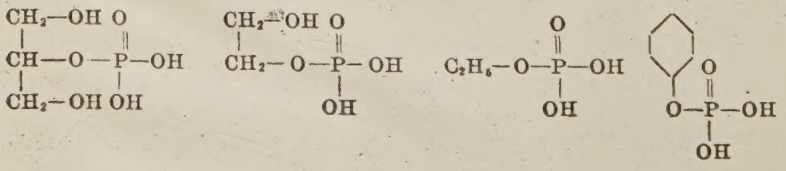
Phosphoesterase wurde früher eingehend von Asakawa(1929)

untersucht. Er hat dabei beobachtet, dass Nierenphosphoesterase auf verschiedene Monoester bei Ph 9–10 optimal wirkt, während das Takaferment je nach der chemischen Konstitution der Monoester bald bei Ph 3.1, bald bei Ph 5.6 die optimale Wirkung ausübt. Das spezifische Verhalten der beiden Phosphoesterasen kann man aus der Ph-Aktivitätskurve klar ersehen. Manaka (1931) hat weiter die Beziehung des Wirkungsbereichs der Phosphoesterase zur chemischen Konstitution der Substrate untersucht und hat dabei gefunden, dass Takaferment, das aus einem Handelspräparat durch Adsorptionsmethode gereinigt wurde, verschiedene Phosphorsäuremonoester ausschliesslich bei Ph 3 optimal hydrolysiert. Das Takaferment, welches von Asakawa untersucht wurde und auch von Manaka hergestellt werden konnte, ist wertvoll zum Studium des Wirkungsmechanismus der Phosphomonoesterase, dagegen trifft das ausschliesslich bei Ph 3 optimal wirkende Takaferment für die Charakterisierung der Phosphomonoesterasen selbst, da eine andere Art Phosphomonoesterase aus Reiskleie durch Verfasser hergestellt werden konnte, von deren unten mitgeteilt wird.

Diese neue Phosphoesterase aus Reiskleie nenne ich von nun an die Kleienphosphoesterase. Die Fermentlösung wurde durch 2 tägige Extraktion von Reiskleie mit Wasser und nachfolgende Dialyse hergestellt und konnte weiter durch die Adsorptionsmethode gereinigt werden. Das enzymatische Verhalten veränderte sich nach dem Adsorptionsverfahren oder selbst nach der Elektrodialyse nicht.

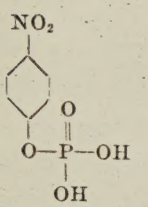
Die Kleienphosphoesterase wirkt auf verschiedene Phosphorsäuremonoester bei Ph 5.4–5.6 optimal. Die untersuchten Substrate sind β-Glycerophosphorsäure (I), Glykophosphorsäure (II), Äthylphosphorsäure (III), Phenylphosphorsäure (IV), p-Nitro-

(I) (II) (III) (IV)

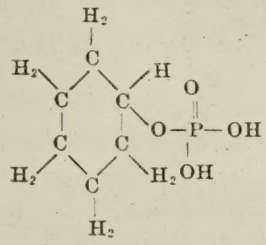


phenylphosphorsäure (V), Cyklohexylphosphorsäure (VI) und 1-Methylcyklohexylphosphorsäure (VII).

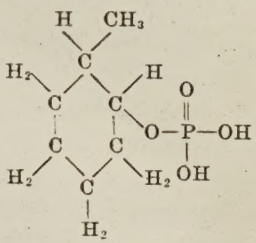
(V)



(VI)



(VII)



Wir haben also 3 Typen Phosphomonoesterasen.

Der erste Typus wird durch die Takaphosphoesterase vertreten; die optimale Azidität ist Ph 3. Der zweite Typus ist das hier mitgeteilte Kleienferment mit der optimalen Azidität Ph 5.5. Der dritte ist die Nierenphosphoesterase, die ihre optimale Wirkung bei Ph 9–10 ausübt.

Dieses Verhältnis ist besonders interessant, wenn man die 3 Typen Phosphoesterasen den Proteinasen gegenüberstellt. Es gibt auch bei den Proteinasen 3 Arten: Pepsin, Papain und Trypsin-Kinase. Die optimalen Aziditäten sind Ph 2, 5 resp. 8. Nach Waldschmidt-Leitz und seinen Mitarbeitern haben diese 3 Proteinasen gemeinsame Angriffspunkte auf genuinem Eiweiss, wie von ihnen (1927) bei der stufenweisen enzymatischen Hydrolyse des Histons nachgewiesen wurde. Dieses Ergebnis der deutschen Autoren betonen wir insbesondere, weil die 3 Phosphoesterasen auch verschiedene Ester von Phosphorsäure gemeinsam aufzuspalten imstande sind.

Ein Vergleich der Phosphoesterasen mit den Proteinasen wird in der folgenden Tabelle gegeben, wobei die Lage der optimalen Azidität bei jedem Ferment angegeben wird.

Typen	Phosphoesterase	Proteinase
1. Typus	Takaferment, Ph 3	Pepsin, Ph 2
2. Typus	Kleienfermet, Ph 5.5	Papain, Ph 5
3. Typus	Nierenferment, Ph 9	Trypsin-Kinase Ph 8

Phosphorsäuremonoester ist eine zweibasische Säure und dissoziiert in zwei Stufen. Dieses elektrochemische Verhalten des Monoesters benutzten wir zur Aufklärung der Kinetik der Phosphoesterase. Asakawa hat früher (1929) dieses Gebiet behandelt, und wenn man seine damals ausgesprochene Idee wieder auf die 3 Phosphoesterasen anwendet, kann man folgendes ausführen:

Taka- und Kleienphosphoesterasen sind Fermente von Säurenatur von Pk 4.8. Nur in undissoziiertem Zustande entfalten die beiden Fermente ihre Wirkung. Bei dem ersten Phosphoesterasen-Typus, dem Takaferment, wirkt das undissoziierte Fermentmolekül auf die in erster Stufe dissoziierte Estersäure. Bei dem zweiten Typus, der Kleienphosphoesterase, reagiert wieder das undissoziierte Fermentmolekül mit der Estersäure, aber in diesem Fall mit dem in zweiter Stufe dissoziierten Substration. Über die elektrochemische Natur der Nierenphosphoesterase sind wir noch nicht in der Lage, etwas bestimmtes auszusagen. Aber aus der Ph-Aktivitätskurve, die von Asakawa ermittelt wurde, kann man sagen, dass Pk des Ferments ist 9.2, wenn es als Säure angenommen wird, oder 4.8, wenn als Base angenommen. In dem Aziditätsbereich, wo der dritte Phosphoesterasentypus, das Nierenferment, eine merkliche Wirkung ausübt, mit anderen Worten, auf der alkalischen Seite von Ph 7, ist der Phosphorsäuremonoester in total dissoziiertem Zustande vorhanden. Mit diesem an beiden Stufen dissoziierten Estersäureion reagiert das Nierenferment in dissoziierter Form, wenn das Ferment als Säure angenommen wird, oder in undissoziierter Form, wenn man dem Ferment eine Basennatur zuschreiben darf. Die Ph-Aktivitätskurve stimmt also in diesem Fall mit der Dissoziationskurve des Ferments selbst überein. Eine Analogie findet man bei Saccharase, wo das Substrat zu dem Nichtelektrolyten gehört und die Ph-Aktivitätskurve wieder ausschliesslich durch die elektrochemische Natur des Ferments bestimmt wird.

Bei Proteinasen wird von Northrop (1923) und Willstätter (1924) angenommen, dass die Ph-Aktivitätskurve durch den Dissoziationszustand des Eiweisses bestimmt wird, und dass es dabei so aussähe, als ob die elektrochemische Natur der Fermente

belanglos sei. Das Eiweisskation wird durch Pepsin angegriffen und das Eiweissanion durch Trypsin-Kinase, während Papain auf das in undissoziierter Form vorhandene Eiweissmolekül einwirkt. Wir sind der Meinung, dass für die Fermentkinetik der Eiweisshydrolyse ausser der Dissoziation des Substrats noch die der Proteinasen selbst in Erwägung gezogen werden sollte, und wünschen uns weitere Studien auf diesem Gebiet.

Experimenteller Teil.

I. Darstellung der Fermentlösung.

50 g Reiskleie wurden mit dem 10 fachen Volumen destillierten Wassers bei 37° 2 Tage digeriert. Bakterieller Infektion wurde durch Toluol und Chloroform vorgebeugt. Der klar filtrierte Extrakt wurde mit destilliertem Wasser 2 Tage lang dialysiert. Das Dialysat konnte gleich zum Versuch gebraucht werden. Ich habe aber diese Fermentlösung durch Adsorption-Elution unter verschiedenen Bedingungen gereinigt und konnte das beste Resultat bei folgendem Verfahren erhalten:

dialysierte Fermentlösung	100 ccm
M/2 Essigsäure	95 ccm
M/2 Natr. acetat	0.5 ccm
gereinigtes Kaolin	5 g

Das Gemisch wurde 1 Stunde in einen Brutschrank von 37° gestellt. Kaolin wurde dann abgesaugt, mit destilliertem Wasser 2 mal gewaschen und mit Phosphatlösung von Ph 6.8 eluiert. Diese bestand aus 50 ccm M/10 Phosphatgemisch (1:1) und 300 ccm Wasser. Die Elution erforderte bei 37° eine Stunde. Das klar filtrierte Elut wurde dann mit destilliertem Wasser dialysiert bis es frei von anorganischem Phosphor war. Die so hergestellte Fermentlösung war vollkommen klar und aktiv, und konnte mit Toluol überschichtet in einem Eisschrank monatelang unverändert aufbewahrt werden.

Die Elektrodialyse wurde mit dem Paulischen Apparat ausgeführt.

II. Phosphorsäureester.

Als β-Glycerophosphorsäure diente Natriumsalz von Kahlbaum. Natrium Monophenylphosphat, Barium Glykolphosphat, Barium Monoäthylphosphat und Barium Cyclohexylphosphat wurden schon früher von Asakawa (1928) und Horiuchi (1931) im hiesigen Institut hergestellt und standen zur Verfügung.

p-Nitrophenylphosphorsäure wurde vom Verfasser nach der Angabe von Rapp (1884) durch Nitrieren der Phenylphosphorsäure hergestellt. Aus warmem Wasser umkristallisiert, bestand sie aus schwach gelb gefärbten Blättchen, frei von Kristallwasser.

$C_6H_6NO_6P$ (219.1) berechnet: P 14.15%
gefunden: P 14.10%

Methylcyclohexylphosphorsäure konnte als Bariumsalz hergestellt werden. Die Darstellungsmethode ist dieselbe wie bei Cyclohexylphosphorsaurem Barium. Das aus wässeriger Lösung mit Alkohol gefällte Salz bildete silberglänzende feinnadlige Kristalle. Kristallwasser frei. Schmelzpunkt 145°.

$C_7H_{13}PO_4Ba$ (329.4) berechnet: P 9.41%, Ba 41.8%
gefunden: P 9.30%, Ba 42.0%

III. Versuchsanordnung.

M/100 Alkalisalzlösung der Substrate wurde vorbereitet. Aethyl- und Glykolphosphatlösung konnten leicht durch Doppelumsetzung des Bariumsalzes mit Kaliumsulfat hergestellt werden. Bei Estern der hydroaromatischen Alkohole wurde das abgewogene Bariumsalz vorher mit einer berechneten Menge Schwefelsäure in freie Säure übergeführt, und die quantitativ in Messkolben einfiltrierte Lösung wurde dann mit einer berechneten Menge Natronlauge neutralisiert.

Pufferlösungen waren M/2 Acetat-Essigsäure und M/10 Glykokoll-Natron.

Fermentlösung war die durch Adsorptionsmethode gereinigte.

Versuchslösung bestand aus:

M/100 Substratlösung	10.0 ccm
Puffer	5.0 ccm
Wasser	5.0 ccm
Fermentlösung	5.0 ccm

Ph elektrometrisch. Die abgespaltete anorganische Phosphorsäure wurde nach Fiske-Subbarow (1925) colorimetrisch bestimmt. Die in den nachstehenden Protokollen angegebenen Ziffern bedeuten die Phosphorsäure als P, für die gesamte Versuchslösung berechnet.

100%ige Hydrolyse soll also 3.1 mg P liefern.

IV. Versuchsergebnisse.

Tabelle I.

β-Glycerophosphorsäure (M/250) + Kleienphosphoesterase.

Ph \ Zeit	1 St.	2 St.
2.97	0.098	0.156
3.71	0.112	0.186
3.76	0.116	0.186
4.09	0.120	0.200
4.65	0.148	0.248
5.02	0.175	0.305
5.44	0.219	0.449
5.68	0.235	0.486
6.07	0.235	0.410
6.18	0.230	0.406
6.49	0.230	0.381
6.61	0.224	0 355
6.70	0.214	0.325
6.90	0.140	0.204
7.00	0.130	0.203
7.20	0.090	0.136
7.56	0.032	0.042
7.80	Spur	Spur
9.29	Spur	Spur
9.77	Spur	Spur

Tabelle II.

β-Glycerophosphorsäure (M/250) + Elektrodialysierte Kleienphosphoesterase.

Ph \ Zeit	1 St.	2 St.
4.95	0.1412	0.2242
5.14	0.1557	0.2437
5.80	0.2137	0.3575
5.96	0.2000	0.3187
6.42	0.1962	0.3115
7.37	0.1008	0.1275
7.71	0.0618	0.0742

Tabelle III.

Phenylphosphorsäure (M/250) + Kleienphosphoesterase

Ph \ Zeit	1 St.	2 St.
3.20	0.180	0.299
4.05	0.332	0.621
5.10	0.595	1.012
5.68	0.675	1.080
6.40	0.514	0.915
7.30	0.169	0.378
9.17	0.031	0.039

Tabelle IV.

Cyclohexylphosphorsäure (M/250) + Kleienphosphoesterase.

Ph \ Zeit	1 St.	2 St.
3.09	0.0753	0.1335
4.00	0.1086	0.2025
5.02	0.1299	0.2565
5.68	0.1640	0.3225
6.32	0.0728	0.1425
7.58	Spur	Spur

Tabelle V.

Glykolphosphorsäure (M/250) + Kleienphosphoesterase.

Ph \ Zeit	1 St.	2 St.
3.27	0.0565	0.0870
3.93	0.0845	0.2000
4.97	0.1755	0.2690
5.68	0.2600	0.4175
6.63	0.1825	0.2975
7.98	Spur	Spur
9.26	Spur	Spur

Tabelle VI.

p-Nitrophenylphosphorsäure (M/250) + Kleienphosphoesterase.

Ph \ Zeit	1 St.	2 St.
3.20	0.1318	0.3950
3.70	0.1950	0.4085
4.60	0.7100	1.1625
5.00	0.7400	1.2075
5.40	0.7500	1.3725
5.69	0.7250	1.2925
5.80	0.6500	1.0425
6.60	0.5000	0.7725
8.60	Spur	Spur

Tabelle VII.

Monoäthylphosphorsäure (M/250) + Kleienphosphoesterase.

Ph \ Zeit	1 St.	2 St.
3.20	0.0585	0.0895
4.02	0.0910	0.1470
5.03	0.1450	0.2140
5.60	0.1767	0.2840
6.05	0.1720	0.2530
7.20	0.1395	0.2175

Tabelle VIII.

Methylcyclohexylphosphorsäure (M/250) + Kleienphosphoesterase.

Pn \ Zeit	1 St.	2 St.	30 St.
3.09	0.2140	0.3225	0.8700
4.00	0.2340	0.3850	0.9100
5.02	0.2940	0.4650	1.0000
5.60	0.3650	0.5250	1.0250
6.30	0.2580	0.4000	....
6.70	0.2360	0.3050	....
7.70	0.1560	0.1820	....
9.12	0	0	....
9.34	0	0	....

LITERATUR.

Asakawa, K. (1929): Journ. of Biochem., **9**, 134.

Fiske, C. H. und Subbarow, Y. (1925): Journ. of biol. Chem., **66**, 375.

Horiuchi, K. (1931): Journ. of Biochem., **14**, 163.

Kurata, K. (1931): Journ. of Biochem., **14**, 25.

Manaka, C. (1931): Journ. of Biochem., **14**, 191.

Northrop, J. H. (1923): Journ. of General Physiol., **5**, 263.

Rapp, M. (1884): Ann. d. Chem., **224**, 157.

Waldschmidt-Leitz, E. und Künstler, G. (1927): Zeitschr. f. physiol. Chem., **171**, 290.

Willstätter, R. (1924): Zeitschr. f. physiol. Chem., **138**, 184.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

ÜBER DIE KLEIENPHOSPHOESTERASE.
Zweite Mitteilung.

Von

SHUICHI UZAWA.

(*Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.*)

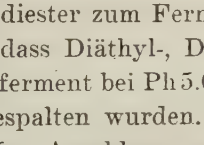
(Eingegangen am 20. August 1931)

Über die Hydrolyse der Phosphorsäuremonoester durch Taka- und Nierenfermente sind durch Asakawa (1929) und Manaka (1931) eingehende Studien gemacht worden. In der vorangehenden Mitteilung hat Verfasser über die Kleienphosphoesterase berichtet. Diese drei Phosphoesterasen, nämlich Taka-, Kleien- und Nierenferment, haben respektive eine spezifische optimale Azidität und sind imstande, recht verschiedene Phosphorsäuremonoester gemeinsam aufzuspalten. Auf Grund dieser Eigenschaft wurde das ganze System der Monoesterhydrolyse aufgeklärt.

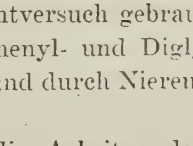
Von der fermentativen Spaltung der Phosphorsäurediester weiss man vorläufig aber nicht viel. Neuberg und Wagner(1926) haben zuerst die enzymatische Hydrolysierbarkeit der Diphenylphosphorsäure angegeben. Asakawa(1929) hat bei seinen Studien über die Kinetik der Phosphoesterasenwirkung auch Phosphorsäurediester zum Fermentversuch gebraucht. Dabei hat er gefunden, dass Diäthyl-, Diphenyl- und Diglycerophosphorsäure durch Takaferment bei Ph 5.6 und durch Nierenferment bei Ph 7.7 optimal aufgespalten wurden.

Im Anschluss an die Arbeiten der vorigen Mitteilung des Verfassers wurden die Versuche über die Kleienphosphoesterasenwirkung auf Phosphorsäurediester unternommen. Als Substrate wurden Diäthylphosphorsäure (I), Diphenylphosphorsäure (II) und Phenyläthylphosphorsäure (III) ausgewählt.

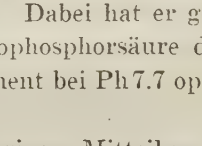
(I)



(II)



(III)



Phosphorsäurediester sind im allgemeinen schwerer als Monoester aufspaltbar, wie aus dem Ergebnis von Asakawa ersichtlich ist. Wir hofften zuerst, dass die Substrate überhaupt durch das Kleienferment gemeinsam in einer bestimmten Azidität optimal hydrolysiert würden, da dies beim Versuch mit Taka- oder Nierenferment der Fall war. Die Versuche sprachen aber gegen unsere Annahme.

Die Hydrolyse der Diäthylphosphorsäure war sehr langsam. Bei M/250 endlicher Konzentration untersucht, konnte selbst nach 96 Stunden nur wenig anorganische Phosphorsäure nachgewiesen werden. Das Optimum war jedoch bei Ph 3. Als die endliche Konzentration des Substrats auf M/25 gesteigert wurde, war die optimale Spaltung bei Ph 3.7 zu beobachten. Dieser Diester konnte jedoch durch das einfach dialysierte Takaferment viel leichter und bei Ph 5.6 optimal aufgespalten werden, wie früher von Asakawa angegeben wurde.

Diphenylphosphorsäure war durch Kleienphosphoesterase etwas leichter hydrolysierbar als Diäthylester. Optimale Azidität war bei M/250 Konzentration des Substrats Ph 4 und bei M/25 Ph 5.

Phenyläthylphosphorsäure war am leichtesten spaltbar, und schon nach 2 Stunden war eine gut messbare anorganische Phosphorsäure nachzuweisen. Optimale Azidität war bei M/250 und M/25 Substratkonzentration Ph 5.1.

Was man aus den Resultaten ersehen kann, ist erstens, dass die optimale Azidität bei der Diesterspaltung durch Kleienphosphoesterase nicht bestimmt ist, und zweitens, dass sie immer je näher zu Ph 5.5 liegt, je leichter das Substrat spaltbar ist, und je höher die Konzentration des Substrats wird.

Es ist vielleicht zu weitgehend, irgend eine Erklärung an diesen Ergebnissen zu versuchen. Wir haben aber doch eine Arbeitshypothese aufgestellt. Von der chemischen Konstitution aus betrachtet, müsste die Hydrolyse der Diester in 2 Stufen ablaufen: die erste Stufe ist die Spaltung in Phosphorsäuremonoester und Alkohol, die zweite die des entstandenen Monoesters in Orthophosphorsäure und Alkohol. Diese letzte Stufe wird bekannt-

lich von Phosphoesterase katalysiert, die jedoch aus einem in der nächsten Mitteilung zu erwähnenden Grunde viel bestimmter Phosphomonoesterase genannt werden soll. Wenn jedoch vorausgesetzt würde, dass die Hydrolyse erster Stufe durch die Phosphomonoesterase unter Mitwirkung irgend eines Aktivators oder überhaupt durch ein Ferment von anderer Art, und zwar optimal bei sauererer Reaktion als Ph 5.5, ausgeführt wird, könnte die Lage der optimalen Azidität je nach den Arten der Diester verschieden herauskommen, da die Hydrolysengeschwindigkeit auf der ersten Stufe bei verschiedenen Diestern nicht immer dieselbe zu sein braucht. Der angenommene katalytische Faktor bei Kleienphosphoesterase wurde bisher noch nicht isoliert. Aber eine Phosphodiesterase, die die oben erwähnte erststufige Hydrolyse katalysiert, wurde im Gift der Schlange Habu (Trimeresurus flavoviridis) gefunden, worüber in der nächsten Mitteilung berichtet werden wird.

Experimenteller Teil.

I. Fermentlösung.

Die Kleienphosphoesterase war dieselbe wie in voriger Mitteilung. Sie wurde durch Adsorptionsmethode gereinigt und dialysiert.

II. Phosphorsäurediester.

A. Diäthylphosphorsäure.

1 Mol $POCl_3$ und 5 Mol Äthylalkohol werden gemischt und unter Rückflusskühler auf dem Wasserbad etwa 3 Stunden, bis die Salzsäureentwicklung aufhörte, erhitzt. Das Reaktionsprodukt wird in Porzellanschale mit überschüssigem Silberoxyd, das vorher mit Wasser schlammig gemacht wurde, umgerührt und auf dem Wasserbad getrocknet. Der Rückstand wird gepulvert und mit absolutem Alkohol extrahiert. Aus dem konzentrierten Auszuge wird Silberdiäthylphosphat durch Zusatz von Äther als schön ausgebildete nadlige Kristalle ausgefällt. Schmelzpunkt 110°.

$C_4H_{10}PO_4Ag$ (261.0) berechnet: P 11.85%, Ag 41.3%
gefunden: P 11.80%, Ag 41.4%

B. Diphenylphosphorsäure.

Diese Säure wurde nach der Angabe von Asakawa (1929) als Kaliumsalz hergestellt.

C. Phenyl-äthylphosphorsäure.

Monophenylphosphoxychlorid wird mit äquivalentem Äthylalkohol versetzt und auf dem Wasserbad unter Rückflusskühler erhitzt, bis HCl-Gasentwicklung aufhört. Der Kolbeninhalt wird mit 6 fachem Volumen Wasser gemischt, wobei der grösste Teil in Lösung geht. Die abgekühlte Lösung wird mit Silberoxyd neutralisiert und filtriert. Beim Eindampfen des Filtrats scheidet sich Silberphenyläthylphosphat in glänzenden Schuppen aus und wird aus heissem Wasser umkristallisiert. Kristallwasserfrei. Schmelzpunkt 105°.

$C_8H_{10}PO_4Ag$ (310.0) berechnet: P 10.0%, Ag 34.9%
gefunden: P 10.0%, Ag 34.5%

III. Versuchsanordnung.

M/10 und M/100 Alkalisalzlösungen der Diester wurden vorbereitet. Das hergestellte Silbersalz der Diäthyl- oder Phenyläthylphosphorsäure konnte durch Doppelumsetzung mit berechneter Menge NaCl leicht in Natriumsalzlösung überführt werden.

Versuchslösung bestand aus:

Diesterlösung (M/10 od. M/100)	10.0 ccm
Puffer	5.0 ccm
Fermentlösung	5.0 ccm
Wasser	5.0 ccm

Die endliche Konzentration war M/25 resp. M/250. Die in den folgenden Protokollen angegebenen Zahlen bedeuten die abgespaltete anorganische Phosphorsäure als P in mg, für die gesamte Versuchslösung berechnet. 100%ige Hydrolyse soll also bei M/25 endlicher Konzentration 31 mg P und bei M/250 Konzentration 3.1 mg P liefern.

Vergleiche hierzu die vorige Mitteilung des Verfassers.

IV. Ergebnisse.

Tabelle I.

Diäthylphosphorsäure (M/250) + Kleienphosphatase.

Ph \ Zeit	48 St.	96 St.
3.00	0.025	0.0396
4.02	Spur	0.0365
5.19	Spur	0.0300
5.74	Spur	Spur
7.38	Spur	Spur
7.94	Spur	Spur
9.15	Spur	Spur

Tabelle II.

Diäthylphosphorsäure (M/25) + Kleienphosphatase.

Ph \ Zeit	24 St.	48 St.
2.60	0.0291	0.0362
3.01	0.0272	0.0422
3.20	0.0287	0.0432
3.70	0.0335	0.0512
4.06	0.0316	0.0487
5.08	0.0265	0.0419

Tabelle III.

Diäthylphosphorsäure (M/250) + Takaphosphatase.

Ph \ Zeit	24 St.
3.00	0.2325
4.02	0.3425
5.60	1.3150
7.20	0.4725

Tabelle IV.
Diphenylphosphorsäure (M/250) + Kleienphosphatase.

Ph \ Zeit	24 St.	48 St.
2.34	0.0171	0.0308
2.52	0.0345	0.0510
3.09	0.0992	0.1715
3.40	0.1025	0.1778
3.70	0.1152	0.2102
4.00	0.1232	0.2180
4.65	0.1101	0.2090
4.80	0.0878	0.1760
5.58	0.0832	0.1640
6.32	0.0735	0.1368
7.38	0.0225	0.0455
9.28	Spur	Spur

Tabelle V.
Diphenylphosphorsäure (M/25) + Kleienphosphatase.

Ph \ Zeit	2 St.	24 St.
3.04	0.0910	0.4035
3.82	0.0925	0.4150
5.07	0.0945	0.4975
5.60	0.0910	0.4450
6.32	0.0870	0.4450
7.40	0.0590	0.1050

Tabelle VI.
Phenyläthylphosphorsäure (M/250) + Kleienphosphatase.

Ph \ Zeit	2 St.	24 St.
3.02	0.0405	0.1242
4.05	0.0450	0.1515
5.05	0.0467	0.1710
5.68	0.0426	0.1515
7.19	0.0293	0.0667
8.56	Spur	Spur
8.96	Spur	Spur

Tabelle VII.
Phenyläthylphosphorsäure (M/25) + Kleienphosphatase.

Ph \ Zeit	1 St.	2 St.
2.57	0.1092	0.1243
3.86	0.1710	0.2388
4.84	0.2475	0.3575
5.04	0.2760	0.3575
5.11	0.2850	0.3790
5.46	0.2580	0.3710
6.19	0.1975	0.2655
6.84	0.1335	0.1605
8.08	0.0906	0.0955

LITERATUR.

Asakawa, K. (1929): Journ. of Biochem., **9**, 134.
Manaka, C. (1931): do., **14**, 191.
Neuberg, B. und Wagner, J. (1927): Biochem. Z., **188**, 227.
Uzawa, S. (1931): Journ. of Biochem., **14**, 373.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

ÜBER DIE PHOSPHOMONOESTERASE UND DIE PHOSPHODIESTERASE.

Von

SHUICHI UZAWA.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 20. August 1931)

Durch eine Reihe von Arbeiten, die im hiesigen Institut unter Leitung von Prof. Akamatsu ausgeführt wurden, sind die Kenntnisse über die Phosphatase bedeutend erweitert worden.

Die Hydrolasen der Phosphorsäuremonoester wurden durch die Studien von Asakawa (1929), Manaka (1931) und Uzawa (1931) in 3 Typen eingeteilt. Sie werden respektive von Taka-, Kleien-und Nierenferment vertreten, und jedes Ferment hat eine für sich spezifische Dissoziationskonstante. Sie sind in einer bestimmten Dissoziationsform enzymatisch aktiv und reagieren mit dem Substrat von einer wieder für jeden Typus Ferment spezifischen Dissoziationsform. Ph–Optima, d. h. Aziditäten von maximaler Reaktionsgeschwindigkeit konnten damit ausgerechnet werden, und diese stimmten vollkommen mit den experimentell beobachteten überein.

Die Hydrolase des Pyrophosphats, dessen Aufspaltung früher ohne tieferen Einblick mit der mancher organischen Phosphorverbindungen zusammen einfach der Wirkung eines einheitlichen Ferments zugeschrieben wurde, konnte durch die Untersuchung von Kurata (1931) scharf definiert werden. Das Ferment, die Pyrophosphatase, ist jetzt frei von Phosphoesterasen isolierbar.

Die fermentative Spaltung des Diphenylpyrophosphats, die durch Studien von Kurata (1931) aufgehellt wurde, ist sehr interessant. Diese zusammengesetzte Verbindung bedarf für ihre Hydrolyse der Wirkung von 2 Fermenten, nämlich Pyrophosphatase und Phosphomonoesterase. Duch Pyrophosphatase bei Anwesenheit eines Aktivators wird jene Verbindung zuerst in zwei

Moleküle Phenylphosphat aufgespalten, und daran schliesst sich erst die Hydrolyse des entstandenen Phenylphosphats durch Phosphomonoesterase als die zweite Stufe des enzymatischen Prozesses.

Von der Hydrolyse der Phosphorsäurediester weiss man bloss, dass diese wohl enzymatisch in Orthophosphorsäure und Alkohol zerlegbar, doch weit schwerer als die entsprechenden Monoester hydrolysierbar sind.

Als Asakawa (1929) die Kinetik der Diesterspaltung vom elektrochemischen Standpunkte diskutieren wollte, musste er noch seine Schlussfolgerungen zurückhalten, weil die damals in Erwägung gezogenen Faktoren ausschliesslich auf die Dissoziation des Ferments und des Diesters beschränkt waren, was nach den heutigen Kenntnissen über Phosphoesterase als unzutreffend bezeichnet werden muss. Der Fermentversuch über Diesterspaltung, der vom Verfasser in der vorangehenden Mitteilnun berichtet wurde, liess uns die Sache dahin betrachten, dass die Diesterspaltung in 2 Stufen ablaufen muss: die erste Stufe ist die Abspaltung eines Moleküls Alkohol aus dem Diester und die zweite Stufe die Hydrolyse des entstandenen Monoesters.

Für die Differenzierung der beiden chemischen Prozesse ist es unbedingt nötig, den abgespalteten Alkohol gleichzeitig mit der anorganischen Phosphorsäure zu bestimmen. Diphenylphosphorsäure wurde darum als Substrat ausgewählt, weil Phenol kolorimetrisch nach Folin-Denis leicht quantitativ zu messen ist, während der anorganische Phosphor wie üblich nach Fiske-Subbarow bestimmbar ist.

Die Fahndung auf das Wesen der Diesterspaltung muss nach folgendem System unternommen werden: Der erste Versuch ist der Nachweis eines Ferments, Phosphomonoesterase, welche Phosphorsäuremonoester z. B. Phenylphosphorsäure aufzuspalten imstande ist, aber nicht die Diphenylphosphorsäure. Wenn solch spezifische Phosphoesterase überhaupt isolierbar wäre, sollte der nächste Gedankengang auf 2 Möglichkeiten gerichtet werden: Erstens könnte die Diphenylphosphorsäure durch irgend ein neues Ferment in Phenol und Phenylmonophosphorsäure aufgespalten werden, ohne dass dabei eine Befreiung der anorganischen Phosphorsäure ein-

tritt, zweitens könnte der Diester eventuell durch Phosphomonoesterase bei Anwesenheit eines Aktivators angreifbar sein. Dabei sollte der Aktivator allein selbstverständlich keine Wirkung auf den Diester ausüben; aber die Produkte der Wirkung des aktivierten Ferments müssen Orthophosphorsäure und Phenol sein, denn es ist eine in der Fermentlehre feststehende Regel, dass ein Ferment selbst nach Aktivierung auch die Wirkung seiner ursprünglichen nichtaktivierten Form beibehält.

Ich habe daher unter Leitung von Prof. Akamatsu zuerst die Isolierung der Phosphomonoesterase durch Adsorptionsverfahren unternommen. Fermentlösung als Ausgangsmaterial war zuerst die einfach dialysierte Takadiastasenlösung: sie spaltete Diphenylphosphorsäure sehr energisch in Phosphorsäure und Phenol. Die benutzten Adsorptionsmittel waren Kieselsäuregel, gelbes Eisenhydroxyd, $MgCO_3$, $Mg(OH)_2$ und Tonerde. Das beste Resultat wurde bei Tonerdebehandlung der mit Essig angesäuerten Lösung erzielt. Die Tonerde-Adsorption wurde 3 mal ausgeführt, und die endlich erhaltene Adsorptionsrestlösung spaltete Monophenylphosphorsäure bei Ph 5.6 zu 96%, aber nicht Diphenylphosphorsäure. Bei letzterer Verbindung war auch keine Phenolspaltung nachweisbar.

Kleienphosphoesterasenlösung wurde auch in derselben Weise mit Tonerde behandelt, und Phosphomonoesterase konnte wieder isoliert erhalten werden.

Elution der gewaschenen Tonerde mit verdünnter Lösung von Natrium-Acetat, sekundärem Phosphat oder ammoniakalischem Glycerin lieferte nur eine mehr oder weniger wirksame Phosphomonoesterasenlösung, die jedoch keine Phenolabspaltung aus Diphenylphosphorsäure hervorbrachte.

Phosphomonoesterase konnte also ziemlich leicht erhalten werden. Dagegen blieb die Art und Weise der enzymatischen Diesterhydrolyse ganz unklar.

Daher wurde mit den dialysierten Autolysaten verschiedener Organe von Schweinen und Kaninchen die Phenolabspaltung aus Diphenylester versucht. Aber jedesmal wenn im Hydrolysat überhaupt Phenol nachweisbar war, wurde die Anwesenheit der

Phosphomonoesterase festgestellt. Bei den Adsorptionsverfahren mit den oben erwähnten verschiedenen Mitteln wurden ab und zu Adsorptionsrestlösungen oder Elute erhalten, die für sich weder Diphenyl- noch Monophenylphosphorsäure angreifen konnten. Solche Lösungen könnten eventuell den hypothetisch angenommenen Aktivator enthalten. Die Experimente brachten aber leider unserer Erwartung zuwider Enttäuschung: Das Gemisch solcher Lösungen und der isolierten Monoesterasenlösung war auf Diphenylphosphorsäure absolut inaktiv.

Die ganz im Dunkel gebliebene Frage der Diesterhydrolyse konnte aber glücklicherweise durch eine andere Untersuchung aufgeklärt werden.

Während der fortgesetzten Untersuchungen über Phosphatase im hiesigen Institut wurde das Problem der Lecithinhydrolyse als Experiment aufgenommen. Lecithin ist eine recht komplizierte Verbindung, und die chemischen Vorgänge bei seiner Hydrolyse müssen aus den Gesichtspunkten der in jüngster Zeit stark erneuerten Fermentlehre analytisch wieder untersucht werden. Aus diesem Grunde hatte ich Gelegenheit, mit Schlangengift zu arbeiten.

Das Gift des Trimeresurus flavoviridis (japanisch „Habu") war imstande, aus Diphenylphosphorsäure ein Molekül Phenol abzuspalten, ohne dass dies von irgend einer Hydrolyse der Monophenylphosphorsäure begleitet war. Wir haben also endlich ein neues Ferment, Phosphodiesterase, gefunden. Das Ph-Optimum der Phosphodiesterase des Habu-Gifts war Ph 8.6. In saurer Reaktion war ihre Wirkung auch vorhanden, aber in vermindertem Grad.

Wie erwähnt, war das Habu-Gift absolut inaktiv auf Phenylphosphorsäure und produzierte bei Hydrolyse des Diesters keinen Phosphor. Aber wenn diese Phosphodiesterase zusammen mit der isolierten Phosphomonoesterase auf Diphenylphosphorsäure einwirken würde, müsste der Zerfall des Diesters in seine Bausteine wohl stattfinden. Dies war in der Tat der Fall. Die Versuche wurden mit 3 Arten Monoesterase angestellt. Über die Differenzierung der Phosphomonoesterase hat Verfasser in der ersten Mitteilung über Kleienphosphoesterase berichtet.

Takaphosphomonoesterase, die nach Tonerdebehandlung isoliert wurde, war imstande, wenn sie mit Schlangengift gemischt wurde, auf Diphenylphosphorsäure derart einzuwirken, dass bei Ph 5.6 in 22 Stunden 15% des sämtlichen Phosphors als anorganische Phosphorsäure abgespalten wurde. Bei Ph 3 wurde fast keine und bei Ph 8 nur 3 %ige Hydrolyse nachgewiesen. Die optimale Azidität der Schlangengift-Diesterase war Ph 8.6, und die der Takamonoesterase Ph 3. Unter Mitwirkung der beiden Fermente war das Optimum unter den untersuchten Bedingungen Ph 5.6. Die Lage des Optimums könnte wohl durch das relative Aktivitätsverhältnis der beiden Fermente beeinflusst werden, doch der Nachweis des Optimums in einer Azidität, die von der jedes einzelnen Ferments weit entfernt ist, ist besonders interessant, weil gerade diese abnorme Lage des Ph-Optimums früher die Aufklärung der Diesterhydrolyse in Verwirrung geraten liess.

Die isolierte Kleienphosphomonoesterase zusammen mit Habu-Gift hydrolysierte Diphenylphosphorsäure in Phosphorsäure und Phenol zu 19% in 24 Stunden bei Ph 4.6. Bei Ph 8 und 4 war die Menge der nachgewiesenen Orthophosphorsäure weit geringer. Die in der vorigen Mitteilung berichteten Resultate der Diesterhydrolyse durch Kleienmono- und Diesterasengemisch in Betracht ziehend, sind wir nun der Meinung, dass eine Art Phosphodiesterase, die in saurer Reaktion ihr Optimum besitzt, in der Zukunft gefunden werden wird.

Den dritten Typus Phosphomonoesterase, der vom Nierenferment vertreten wird, habe ich bisher nicht in isoliertem Zustand erhalten. Das von mir untersuchte dialysierte Nierenautolysat aus Kaninchen zeigte schon für sich bei Ph 7.6 eine so starke Diphenylesterspaltung, dass 6% des gesamten Phosphors nach 26 Stunden in anorganischer Form nachgewiesen werden konnten. Aber als das Nierenautolysat vorher mit Habu-Gift versetzt wurde, stieg der Hydrolysen-Grad unter denselben Bedingungen und in derselben Zeitdauer auf 20%, und bei Ph 8.6 betrug die nachgewiesene Spaltung sogar 35%, während bei dieser Azidität die Nierenphosphataselösung allein höchstens eine 5 %ige Hydrolyse ausüben konnte.

Ich möchte hier noch hinzufügen, dass das Gift von Ancistrodon blomhoffi (japanisch „Mamushi") auch Phosphodiesterase enthält.

Unser Institut ist der Takeda Pure Chemicals, Ltd., Osaka, zu bestem Dank verpflichtet für die freundliche Vermittelung des Habu-Gifts. Das Gift wurde von der hygienischen Abteilung der Okinawa Präfektur geliefert. Der hygienischen Abteilung und Herrn Prof. N. Ogata, dem Direktor des Bakteriologischen Instituts der hiesigen Akademie, der uns Mamushi-Gift freundlicherweise lieferte, spreche ich meinen herzlichen Dank aus.

Experimenteller Teil.

I. Darstellung der Fermentlösungen.

A. Takaphosphomonoesterase.

Die einfach dialysierte 5%ige Takadiastasenlösung wurde mit 1/5 Volumen M/2 Essigsäure angesäuert, dann mit 1/5 Volumen 1%iger Tonerdesuspension C_γ versetzt und eine Stunde unter zeitweisem Umrühren in einen Brutschrank von 37° gestellt. Nach Abzentrifugieren der Tonerde wurde die überstehende Flüssigkeit nochmals mit dem oben erwähnten Volumen Tonerdesuspension in gleicher Weise behandelt. Die Tonerdebehandlung wurde noch einmal wiederholt, und die endlich erhaltene Adsorptionsrestlösung mit destilliertem Wasser dialysiert.

B. Kleienphosphomonoesterase.

Diese Lösung wurde genau so wie die Takalösung aus dem einfach dialysierten Reiskleienextrakt durch Tonerdebehandlung hergestellt. Über die Extraktion der Reiskleie siehe die vorige Mitteilung des Verfassers.

C. Nierenphosphoesterase.

Sie wurde aus Kaninchenniere nach dem im hiesigen Institut üblichen Autolysenverfahren hergestellt und mit Wasser bis zur Phosphorfreiheit dialysiert.

II. Substrat.

Diphenylphosphorsaures Kalium und Monophenylphosphorsaures Natrium wurden, im hiesigen Institut hergestellt.

III. Versuchsanordnung.

Die Zusammensetzung der Versuchslösungen wird in den Protokollen bei jedem Versuch angegeben. Die Versuchstemperatur war überall 37°. Ph elektrometrisch. Pufferlösungen waren M/2 Essigsäure-Acetat und M/10 Glykokoll-Natron. Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure wurde nach Fiske-Subbarow (1925) ausgeführt. Phenolbestimmung kolorimetrisch nach Folin-Denis (1915).

In folgenden Protokollen angegebene Ziffern bedeuten nachgewiesenes Phenol oder anorganischen Phosphor in mg, für die gesamte Versuchslösung berechnet.

Von einer Berechnung der Hydrolysenprozente ist bei Monophenylphosphorsäure ganz klar. Bei Diesterhydrolyse durch das Mono-und Diesterasengemisch wurde die nachgewiesene Phosphormenge zur Berechnung der prozentualen Zahl aufgenommen. Bei der Wirkung des Schlangengifts, der reinen Phosphodiesterase, wurde die prozentuale Hydrolyse selbstverständlich aus dem gemessenen Phenol errechnet.

IV. Veesuchsprotokolle.

A. Wirkung der isolierten Takaphosphomonoesterase.

	Monophenylphosphat		Diphenylphosphat	
	Hauptversuch	Kontrolle	Hauptversuch	Kontrolle
M/100 Substrat	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm
Puffer	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
Fermentlösung	5.0 ccm	0	5.0 ccm	0
Wasser	5.0 ccm	10.0 ccm	5.0 ccm	10.0 ccm
Ph	5.6	5.6	5.6	5.6
P in mg nach 24 St.	2.97(96%)	0	0	0

B. Wirkung der isolierten Kleienmonoesterase.

	Monophenylphosphat		Diphenylphosphat	
	Hauptversuch	Kontrolle	Hauptversuch	Kontrolle
M/100 Substrat	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm
Puffer	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
Fermentlösung	5.0 ccm	0	5.0 ccm	0
Wasser	5.0 ccm	10.0 ccm	5.0 ccm	10.0 ccm
Ph	5.6	5.6	5.6	5.6
P in mg nach 22 St.	2.729(89%)	0	0	0

C. Wirkung des Habu-Gifts.

(1) Diphenylphosphatspaltung.

Versuchslösung bestand aus:

M/100 Diphenylphosphat	10.0ccm
Puffer	5.0ccm
0.2 %ige Giftlösung	5.0ccm
Wasser	5.0ccm

Ph \ Zeit in mg	24 St.		48 St.	
	Phenol	P	Phenol	P
3.0	Spur	0	/	/
4.0	0.426	0	/	/
4.9	0.666	0	/	/
5.5	0.826	0	/	/
5.8	0.950	0	/	/
7.5	1.240	0	/	/
8.0	1.43	0	2.080	0
8.6	1.910(22%)	0	2.640(28%)	0
9.4	1.330	0	2.220	0

(2) Monophenylphosphatspaltung.

Substrat war Monophenylester. Versuchslösung wie oben. Bei allen Aziditäten war weder Phosphor noch Phenol nachweisbar.

(3) Kontrollversuche.

Diphenylester selbst war unter denselben Bedingungen sehr beständig. Habu-Gift allein lieferte auch unter denselben Bedingungen weder phenolartige Substanz noch anorganischen Phosphor in messbarer Menge.

D. Wirkung des Habu-Gifts + Takaphosphomonoesterase.

Ph	3.0	5.6	8.0
M/100 Diphenylphosphat	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm
Puffer	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
Takamonoesterase	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
0.2% Giftlösung	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
P in mg nach 24 St.	0	0.4675 (15%)	0.1006 (3.2%)
P in mg nach 50 St.	Spur	0.770 (26%)	0.263 (8.5%)

Als Kontrollversuche wurden 10.0 ccm Diesterlösung mit Wasser versetzt. Bei Ph 3.0, 5.6 und 8.0 war nach 24 und 50 Stunden kein Phosphor nachweisbar.

E. Wirkung des Habu-Gifts + Kleienphosphomonoesterase.

Ph	3.0	4.0	5.6	8.0
M/100 Diphenylphosphat	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm
Puffer	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
Kleienphosphomonoesterase	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
0.2% Giftlösung	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
P in mg nach 24 St.	0	0.0550 (1.8%)	0.585 (18.9%)	0.400 (12.9%)

Kontrollversuche wurden wie bei vorigem Experiment ausgeführt. Nach 24 Stunden kein nachweisbarer Phosphor.

F. Wirkung des Habu-Gifts + Nierenphosphoesterase.

Ph	Nierenferment allein			Habu-Gift + Nierenferment		
	7.6	8.0	8.6	7.6	8.0	8.6
M/100 Diphenylphosphat	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm	10.0 ccm
Puffer	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
Nierenphosphatase	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
0.2 % Giftlösung	0	0	0	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm
Wasser	5.0 ccm	5.0 ccm	5.0 ccm	0	0	0
P in mg nach 26 Stunden	0.1854	0.1776	0.1510	0.6160	0.7600	1.090
Spaltung in %	5.97	5.70	4.85	19.9	24.5	35.0

Kontrollversuche ergaben wieder dass das Gemisch des Habu-Gifts und der Nierenphosphoesterase ohne Vorhandensein des Diphenylphosphats unter denselben Bedingungen keine messbare Menge von anorganischem Phosphor lieferte.

LITERATUR.

Asakawa, K. (1928): Journ. of Biochem., **10**, 157.
Asakawa, K. (1929): Journ. of Biochem., **9**, 143.
Folin, O. u. Denis, W. (1915): Journ. of biolo. Chem., **22**, 305.
Kurata, K. (1931): Journ. of Biochem., **14**, 25.
Manaka, C. (1931): do., **14**, 191.
Uzawa, S. (1931): do., **14**, 373.
Uzawa, S. (1931): do., **14**, 383.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

A REVISION OF THE ARTICLE "ON THE CO_2 ABSORPTION VELOCITY OF NaOH- AND KOH-SOLUTION."

By

KIYOSHI MASAKI.

(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University. Director: Prof. Dr. Shoji.)

(Received for publication, August 24, 1931)

In the above-mentioned article, which appeared in Vol. XIII, p. 211 of this Journal, I reported the experiments in which a bubble of CO_2 gas was passed through the 1N solution of NaOH or KOH, and the time, t, was measured, which was necessary for the half volume, V, of the bubble to be absorbed. On treating the results, I assumed V/t as the representative of the CO_2-absorption velocity of the solution, and obtained the following conclusions: The ratio of the CO_2-absorption velocity of the NaOH solution to that of the KOH solution is 1:0.93 at 11°, 1:1.17 at 18° and 1:1.29 at 25°.

Prof. S. Mitsukuri, of the Tohoku University, suggested to me the following treatment:—The velocity of diminution of the bubble volume, v, should be proportional to its surface, s, so that

$$-\frac{dv}{dt} = ks \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

where k is a constant representing the absorption velocity. Now, r being the radius of the spherical bubble, we have

$$v = \frac{4}{3}\pi r^3, \qquad \text{and} \qquad s = 4\pi r^2,$$

and so $$s = \sqrt[3]{36\pi v^2}.$$

Substituting this in (1)

$$-\frac{dv}{\sqrt[3]{36\pi v^2}} = kdt.$$

Integrating this equation between the limits v_1, t_1, and v_2, t_2,

$$\sqrt[3]{\frac{3}{4\pi}}(\sqrt[3]{v_1}-\sqrt[3]{v_2})=k(t_2-t_1).$$

In our case, $v_2=V$, $v_1=2V$, and $t_2-t_1=t$, so that the equation becomes

$$(\sqrt[3]{2}-1)\sqrt[3]{\frac{3}{4\pi}V}=kt \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

The left side of this equation is the diminution of the radius of the bubble, when it is reduced to its half volume. The proof is quite simple. r_1 being the radius thus reduced, and r_2 that of the remaining bubble of the half volume, we have

$$\frac{4}{3}\pi(r_1+r_2)^3=2V, \qquad \text{and} \qquad \frac{4}{3}\pi r_2^3=V,$$

and so

$$r_1=\sqrt[3]{\frac{3}{4\pi}2V}-\sqrt[3]{\frac{3}{4\pi}V}=(\sqrt[3]{2}-1)\sqrt[3]{\frac{3}{4\pi}V}. \qquad \text{Q. E. D.}$$

Calculating the numerical factor of the equation (2), we have

$$\frac{0.1612\sqrt[3]{V}}{t}=k \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (3)$$

The value of k calculated by this equation from our experimental data of V and t gives a fairly good constant for each set of experiments. See the protocol attached to this article. This proves that the assumption given by the equation (1) is correct.

From this revised treatment of our data, the following table is obtainable:

Temp.	k_{NaOH}	k_{KOH}	$k_{NaOH}:k_{KOH}$
11°	0.114±0.0012	0.117±0.0039	1:1.03±0.036
18°	0.149±0.0033	0.183±0.0031	1:1.23±0.034
25°	0.172±0.0017	0.200±0.0020	1:1.16±0.016

It seems that the ratio $k_{NaOH}:k_{KOH}$ is independent of the temperature. So, taking the mean, we have

$$k_{NaOH}:k_{KOH}=1:1.14\pm0.013$$

Conclusion.

The CO_2-absorption velocity of the KOH-solution of 1N is 1.14 times larger than that of the NaOH-solution of the same concentration at any temperature between 11° and 25°C.

My cordial thanks are due to Prof. Mitsukuri for his pregnant suggestion.

Protocol

Absorption medium	Temp.	No. of exper.	V cc.	t	$\frac{0.1612\sqrt[3]{V}}{t}=k$
1 N NaOH-solution	11°	1	0.144	0.780	0.108
		2	0.160	0.764	0.115
		3	0.161	0.760	0.115
		4	0.140	0.684	0.122
		5	0.150	0.768	0.112
		6	0.168	0.804	0.111
		7	0.145	0.720	0.118
		mean			0.114±0.0012
	18°	1	0.194	0.680	0.137
		2	0.176	0.786	0.115
		3	0.144	0.640	0.132
		4	0.155	0.556	0.156
		5	0.150	0.546	0.157
		6	0.155	0.580	0.149
		7	0.133	0.532	0.155
		8	0.161	0.600	0.146
		9	0.144	0.530	0.159
		10	0.135	0.468	0.177
		11	0.169	0.584	0.153
		mean			0.149±0.0033
	25°	1	0.151	0.544	0.158
		2	0.137	0.464	0.179
		3	0.129	0.450	0.181
		4	0.157	0.496	0.175
		5	0.141	0.486	0.173
		6	0.154	0.506	0.171
		7	0.145	0.508	0.167
		8	0.168	0.516	0.172
		mean			0.172±0.0017

Protocol (continued)

Absorption medium	Temp.	No. of exper.	V cc.	t	$\frac{0.1612\sqrt[3]{V}}{t}=k$
1 N KOH-solution	11°	1	0.112	0.535	0.145
		2	0.176	0.650	0.139
		3	0.132	0.720	0.114
		4	0.123	0.815	0.099
		5	0.121	0.758	0.105
		6	0.130	0.750	0.109
		7	0.126	0.744	0.109
		8	0.122	0.676	0.118
		mean			0.117±0.0039
	18°	1	0.126	0.460	0.175
		2	0.163	0.490	0.180
		3	0.140	0.520	0.161
		4	0.155	0.420	0.206
		5	0.135	0.404	0.205
		6	0.129	0.440	0.185
		7	0.128	0.424	0.192
		8	0 190	0.550	0.169
		9	0.126	0.460	0.176
		10	0.158	0.480	0.182
		mean			0.183±0.0031
	25°	1	0.194	0.454	0.206
		2	0.193	0.460	0.203
		3	0.154	0.440	0.196
		4	0.147	0.440	0.193
		mean			0.200±0.0020

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS LINSENEIWEISS BEI KATARAKT.

Von

TAIKI TSUJI.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama) und der Ophthalmologischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. Y. Shoji) der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu-Universität zu Fukuoka, Japan.)

(Eingegangen am 15. September, 1931)

Schon seit langem hat man auf allen Gebieten Untersuchungen über die Augenlinse, die mit der Entstehungsweise der Linsentrübung und besonders des Altersstars zusammenhängen, durchgeführt und infolge der schnellen Fortschritte der Biochemie sind in neuerer Zeit auch auf diesem Gebiete zahlreiche Forschungsergebnisse veröffentlicht worden. Da ist es denn auffallend, dass die Linsentrübung, insbesondere die Frage der Entstehungsweise des Altersstars, eine der grössten Fragen auf ophthalmologischem Gebiete, bisher noch ungelöst geblieben ist. Wir haben auf diesem Gebiete noch viele Fragen, die der Beantwortung harren.

Als erste Stufe zur Lösung dieser Fragen habe ich hauptsächlich Untersuchungen über das Linseneiweiss angestellt.

I. Altersveränderungen und kataraktöse Veränderungen des Linseneiweisses.

Mörner (1894) hat gründliche Untersuchungen über das Linseneiweiss angestellt, die noch jetzt als allgemein gültig anerkannt werden. Danach besteht das Linseneiweiss aus 4 Fraktionen, dem Albumoid, dem α-Kristallin, dem β-Kristallin und dem Albumin. Diese Eiweissarten hat er nach ihren Eigenschaften eingeteilt, d. h. das Albumoid ist in Wasser unlöslich, während das α-Kristallin, das β-Kristallin und das Albumin wasserlöslich sind; das α-Kristallin wird durch Essigsäure ausgefällt, während das β-Kristallin und das Albumin nicht durch Essigsäure ausfällbar

sind. Das β-Kristallin wird durch Sättigung mit $MgSO_4$ ausgefällt, während das Albumin auf diese Weise nicht ausgefällt werden kann.

Über die kataraktösen Veränderungen und Altersveränderungen des Linseneiweisses hat Jess (1913) eingehende Untersuchungen angestellt. Bei seinen Untersuchungen mit Rinderlinseneiweiss kam er zu dem Ergebnisse, dass das Linseneiweiss proportional zum Alter zunimmt, dass aber dabei der Vermehrungsgrad des wasserlöslichen Eiweisses nur ein geringer, d. h. der %-Gehalt dem Alter umgekehrt proportional ist. Bei dem Altersstar des Rindes ist das Gesammteiweiss und das wasserlösliche Eiweiss vermindert, das wasserunlösliche Eiweiss dagegen vermehrt. Er fand weiter, dass das β-Kristallin auf die Cysteinreaktion stark positiv reagiert, während die Altersstarlinse negativ reagiert, und vermutete daher, dass beim Altersstar das β-Kristallin verschwindet.

Ausser Jess haben Shoji (1922), Bürger und Schlomka (1927) und Salit (1930) gefunden, dass in der gesunden Rinderlinse das Gesamteiweiss proportional dem Alter zunimmt, während Cahn (1881) und Salit (1930) fanden, dass bei dem Menschen beim Altersstar das Gesamteiweiss vermindert ist.

Nach den Ergebnissen dieser Autoren zu schliessen, nimmt der Eiweissgehalt der Linse proportional dem Alter zu, während er sich beim Altersstar vermindert.

Ich habe die Arbeit von Jess nachgeprüft und um die Altersveränderungen und die kataraktösen Veränderungen, besonders die Veränderungen des β-Kristallins zu untersuchen, den Eiweissgehalt bei der normalen Linse und bei experimentellem Katarakt bestimmt.

Zunächst habe ich zur Bestimmung jeder einzelnen Eiweissfraktion nach Jess eine Wasseremulsion der Linse filtriert um das Albumoid auszuscheiden, doch habe ich kein klares Filtrat erhalten können, sodass also die quantitative Bestimmung des Albumoides zum mindesten sehr schwer wurde. Danach habe ich der Wasseremulsion der Linse tropfenweise Essigsäure zugesetzt, und so wurden das α-Kristallin und das Albumoid, wie von Mörner schon angegeben worden ist, gefällt und dann durch weiteren Zusatz von

Essigsäure gelöst. Auf Grund dieser Tatsache habe ich eine Trennung des Linseneiweisses durchzuführen versucht. Erstens habe ich einer kleinen Menge der Wasseremulsion der Linse Essigsäure zugesetzt und die zur Maximumpräzipitation notwendige Essigsäuremenge festgestellt, dann die zur Maximumpräzipitation der Mutterlauge notwendige Essigsäuremenge berechnet und diese der Mutterlauge zugesetzt. Diesmal wurde das α-Kristallin und das Albumoid vollständig gefällt, und in der dialysierten überstehenden Flüssigkeit trat mit Essigsäure fast gar kein Niederschlag mehr auf. Daher wurde eine vollkommene Trennung von α-Kristallin, Albumoid einerseits und β-Kristallin, Albumin andererseits ermöglicht. Ich habe daher das Linseneiweiss mit Hilfe von Essigsäure in der A-Fraktion (Albumoid und α-Kristallin) und der B-Fraktion (β-Kristallin und Albumin) getrennt bestimmt. Bei dieser Bestimmungsweise fand ich, dass, da der Gehalt an Albumin ein sehr geringer ist (nach Mörner 0.5% des Gesamteiweisses), man einen Anhaltspunkt für den Gehalt der B-Fraktion an β-Kristallin erhält, und so eine genaue Verfolgung der Veränderungen in der letzteren möglich wird.

Jess hat den Gesamteiweissgehalt aus dem Gesamtstickstoffgehalt der Linse berechnet, dagegen habe ich mit Sulfosalicylsäure das Gesamteiweiss gefällt und dann aus dem N-Gehalt den Gesamteiweissgehalt berechnet.

Bestimmungsmethode.

Von dem sofort nach der Schlachtung exstirpierten Rinderauge wurde die Linse innerhalb einer Stunde nach der Schlachtung ausgelöst, und weiter auch bei Kaninchen die Linse sofort nach der Tötung entnommen.

Nach der Wägung wurde die Linse mit Seesand und Wasser im Glasmörser zerrieben, gewaschen, auf das konstante Volum (Rind 250 ccm, Kalb 100 ccm und Kaninchen 50 ccm) aufgehüllt, über Nacht in der Eiskammer stehengelassen, dann geschüttelt, und die Eiweissbestimmung ausgeführt.

Gesamteiweiss: Zur Bestimmung des Gesamteiweisses wurde zu der Linsenemulsion (Rind 25 ccm, Kalb 15 ccm und Kaninchen

10 ccm) 20%ige Sulfosalicylsäure hinzugefügt, das Eiweiss ad maximum ausgefällt, 30 Minuten lang stehen gelassen und darauf zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 15 ccm konzentrierter Schwefelsäure in einen Kjeldahl-Kolben eingebracht, und darauf der N-Gehalt bestimmt.

A-Fraktion: Zu 5 ccm der Linsenemulsion wurde N/100 Essigsäure hinzugefügt, die zur Maximumpräzipitation nötige Essigsäuremenge festgestellt, und die zur Maximum-präzipitation der Mutterlauge nötige Essigsäuremenge berechnet. Der Mutterlauge (Rind 50 ccm, Kalb 20 ccm und Kaninchen 20 ccm) wurde mittels Mikrobürette tropfenweise N/100 Essigsäure hinzugefügt, 30 Minuten still stehen gelassen und dann zentrifugiert. Dem Niederschlag wurden 15 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt, und der N-Gehalt nach Kjeldahl bestimmt.

B-Fraktion: Die Differenz zwischen Gesamteiweiss und A-Fraktion wurde als B-Fraktion festgestellt.

Berechnung: Aus dem N-Gehalt wurde der Eiweissgehalt berechnet. Als Faktor habe ich den von Mörner bestimmten benützt, d. h. für das Gesamteiweiss 5.9666 und für die A-Fraktion 6.0024.

Resultate und Kritik.

Mittels der oben beschriebenen Methode habe ich bei derselben Linse immer zweimal dieselbe Bestimmung vorgenommen, und immer übereinstimmende Resultate erhalten. Bei Kaninchen habe ich wegen der geringen Mengenverhältnisse die Bestimmung nur einmal vorgenommen.

Als experimentellen Katarakt habe ich bei Kaninchen den Massagekatarakt und den Naphthalinkatarakt untersucht. Bei dem Massagekatarakt habe ich die Vorderkammer des Auges der einen Seite punktiert, durch 5 Minuten lange Massage von oben her Linsentrübung erzeugt und dann den Vergleich mit dem Auge der anderen Seite angestellt.

Bei dem Naphthalinkatarakt habe ich zunächst das Auge der einen Seite exstirpiert, das Linsengewicht und den Eiweissgehalt bestimmt und nach 2 Wochen mit der Naphthalinfütterung (4 gr

p. d.) begonnen. Die Vergiftungserscheinungen waren schwer, und die Tiere starben noch ehe sich eine wahre Linsentrübung einstellte. Ich habe dann innerhalb 12 Stunden nach dem Tode die Linse extrahiert und den Eiweissgehalt bestimmt, doch habe ich zwischen beiden Augen (Tabelle IV) fast gar keine Differenz feststellen können.

Nach der Methode von Adams (1930) habe ich bei Kaninchen bei Verabreichung von 3.0–5.0 g Naphthalin mit 3.0–4.0 g Traubenzucker und einer kleinen Menge flüssigen Paraffins auf beiden Seiten fast im gleichen Grade eine milchig weisse Trübung bekommen. Bei dem Auge der einen Seite habe ich zum Vergleiche mit der normalen Linse (Tabelle II) die Eiweissbestimmung und bei dem Auge der anderen Seite die Cysteinbestimmung ausgeführt.

Meine Ergebnisse bei der Bestimmung des Linseneiweisses von Rindern (Tabelle I) zeigen, dass sich das Linseneiweiss mit dem Alter vermehrt, d. h. also, dass meine Resultate mit denen früherer Forscher übereinstimmen. Weiter geht aus meinen Untersuchungen hervor, dass sich der %-Gehalt an der B-Fraktion dem Alter umgekehrt proportional ändert. Diese Tatsache stimmt mit der Angabe von Jess überein, nach der der Prozentgehalt an löslichem Eiweiss dem Alter umgekehrt proportional verändert wird. Dass der Vermehrungsgrad des β-Kristallins schwach ist, wird daraus klar.

Tabelle I.
Bestimmung des Eiweisses in normalen Rinderlinsen.

Nr.	Alter	Gewicht der Linse	Total-eiweiss		A-Fraktion		B-Fraktion		A-Fraktion : B-Fraktion
	(Tage)	g	g	%	g	%	g	%	
1	2	0,8544	0,2505	29,31	0,0472	5,52	0,2033	22,55	19:81
2	7	0,7842	0,2227	28,39	0,0462	5,89	0,1765	22,50	21:79
3	„	0,8082	0,2401	29,70	0,0512	6,33	0,1889	22,13	21:79
4	15	0,8972	0,2673	29,79	0,0483	5,38	0,2190	24,40	18:82
5	20	0,9419	0,2712	18,79	0,0525	5,57	0,2187	23,21	19:81
D. S.		0,8571	0,2503	29,20	0,0490	5,71	0,2013	23,49	20:80

6	(Jahre) 6	2,0578	0,6760	32,85	0,3738	18,16	0,3022	14,69	55:45
7	„	2,1272	0,7097	33,36	0,3676	17,28	0,3421	16,08	52:48
8	„	2,1755	0,7255	33,34	0,3717	17,08	0,3528	16,26	51:49
		(2,1201	0,7637	33,18	0,3710	17,50	0,3327	15,68	53:45)
9	7	2,2313	0,7392	33,12	0,4285	19,20	0,3107	13,92	58:42
10	„	2,2986	0,7152	31,11	0,4495	19,55	0,2657	11,56	63:37
11	„	2,4565	0,8131	33,09	0,4385	17,85	0,3746	15,24	54:46
12	„	2,6086	0,8506	32,06	0,4988	19,12	0,3518	13,47	59:41
13	„	2,6202	0,8979	34,26	0,5672	21,64	0,3307	12,62	63:37
		(2,4430	0,8032	32,83	0,4765	19,47	0,3267	13,36	59:41)
14	8	2,5482	0,8666	34,00	0,5402	21,19	0,3264	12,80	62:38
15	9	2,5289	0,8639	34,16	0,5540	21,90	0,3099	12,23	64:36
D. S.		2,3652	0,7857	33,21	0,4589	19,40	0,3268	13,81	58:42

Ich habe festgestellt, dass bei normalen Kaninchen das Linsengewicht und der prozentuale Eiweissgehalt der Linsen beider beiden Augen keine grossen Unterschiede zeigen. (Tabelle II).

Tabelle II.

Bestimmung des Eiweisses in normalen Kaninchenlinsen.

Nr.	Gew. des Tieres	Gew. der Linse	Total-eiweiss		A-Fraktion		B-Fraktion		A-Fraktion : B-Fraktion
	g	g	g	%	g	%	g	%	
1	1750	0,3665	0,1231	33,58	0,0315	8,59	0,0916	24,99	26:74
		0,3517	0,1273	36,19	0,0304	8,64	0,0969	27,55	26:76
2	1700	0,3784	0,1127	29,78	0,0325	8,58	0,0802	21,19	29:71
		0,3681	0,1180	32,05	0,0325	8,82	0,0802	23,23	27,5:72,5
3	2500	0,4782	0,1670	34,92	0,0693	14,47	0,0977	20,43	41:59
		0,4778	0,1670	34,95	0,0682	14,27	0,0988	20,68	41:59
4	2600	0,4271	0,1503	35,19	0,0399	9,34	0,1104	25,84	27:73
		0,4247	0,1503	35,38	0,0409	9,62	0,1094	25,75	27:73
5	1800	0,3746	0,1231	32,86	0,0336	8,96	0,0895	23,89	27:73
		0,3737	0,1252	33,50	0,0346	9,25	0,0906	24,24	28:72
6	2050	0,5353	0,1962	36,65	0,0955	17,84	0,1007	18,81	48:52
		0,5317	0,1983	37,29	0,0976	18,35	0,1007	18,94	50:50
7	2780	0,5273	0,1837	34,84	0,0819	15,53	0,1018	19,30	45:55
		0,5220	0,1879	35,99	0,0819	15,68	0,1060	20,31	44:56
D. S.			0,1522	34,71	0,0550	12,54	0,0972	22,17	

Tabelle III.

Bestimmung des Eiweisses in kataraktösen Kaninchenlinsen (Message).

Nr.	Gew. des Tieres	Gew. der Linse	Total eiweiss	A-Fraktion	B-Fraktion	A-Fraktion : B-Fraktion	Beobachtungsdauer
	g	g	g %	g %	g %		(Tage)
1	2850	0,5199	0,1878 36,12	0,0787 15,13	0,1091 20,98	42:58	10
		*0,7076	0,1523 21,52	0,1092 15,43	0,0431 6,09	72:28	
2	2900	0,6005	0,2087 34,75	0,0945 15,73	0,1142 19,01	45:55	10
		*0,8723	0,1737 19,90	0,1292 14,81	0,0445 5,10	74:26	
3	2400	*0,4850	0,0709 14,61	0,0609 12,55	0,0100 2,06	86:14	14
		0,3862	0,1315 34,04	0,0315 8,15	0,1000 25,89	24:76	
			Total-N	Eiweissgehalt berechnet aus Total-N			
4	2215	*0,6510	0,0247 3,79	0,1462 22,45			33
		0,5110	0,0344 6,73	0,2052 40,15			

* kataraktöse Linse.

Tabelle IV.

Bestimmung des Eiweisses in kataraktösen Kaninchenlinsen (Naphthalin).

Nr.	Gew. des Tieres	Gew. der Linse	Total-eiweiss	A-Fraktion	B-Fraktion	A-Fraktion : B-Fraktion	Beobachtungsdauer
	g	g	g %	g %	g %		(Tage)
1	2650	*0,5841	0,1878 32,15	0,0966 16,53	0,0912 15,61	51:49	7
	1650	0,5552	0,2025 36,47	0,0976 17,57	0,1049 18,89	48:52	
2	2357	0,5241	0,1920 36,63	0,0892 17,01	0,1028 19,61	46:54	6
	1750	*0,5510	0,1753 31,81	0,0871 15,80	0,0882 16,00	50:50	
3	2300	*0,4317	0,1439 33,33	0,0483 11,18	0,0956 22,14	34:66	3
	1600	0,4062	0,1398 34,41	0,0483 11,89	0,0915 22,52	35:65	
4	2150	*0,4730	0,1377 29,11	0,0399 8.43	0,0978 20,67	29:71	3
	1900	0,4283	0,1397 32,61	0,0399 9,31	0,0998 23,30	29:71	
5	2250	*0,4700	0,1670 35,53	0,0661 14,06	0,1009 21,46	40:60	7
	1850	0,4711	0,1649 35,00	0,0682 14,48	0,0967 20,52	41:59	
6	2050	*0,5119	0,1837 35,88	0,0892 17,42	0,0945 18,46	49:51	9
	1500	0,5270	0,1857 35,23	0,0892 16,92	0,0965 18,31	48:52	

* kataraktöse Linse.

Körpergewicht oben: Beginn der Naphthalinfütterung.
unten: Exstirpationszeit.

Bei dem experimentellen Katarakt des Kaninchens (Tabellen III bis V) habe ich eine Verminderung in dem Gesamteiweiss und der B-Fraktion und eine Vermehrung in der A-Fraktion festgestellt. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von früheren Forschern betreffs des Altersstars erhobenen Befunde überein; ein Beweis dafür, dass bei dem experimentellen Katarakt ebenso wie beim Altersstar eine Eiweissverminderung eintritt, und die Sicherung der Behauptung von Jess, nach der bei Katarakt das β-Kristallin verschwindet.

Jess hat festgestellt, dass bei Altersstar die Menge des wasserlöslichen Eiweisses vermindert wird, und vermutet, dass ebenso auch die des α-Kristallins vermindert wird. Nach meinen Versuchen mit dem experimentellen Katarakt, besonders dem Naphthalinkatarakt, verschwindet die B-Fraktion fast vollständig, doch wird mit Essigsäure eine grosse Menge Substanz ausgefällt. Daher wird bei Katarakt die Menge des α-Kristallins nicht vermindert, sondern eher vermehrt.

II. Cystein- und Cystingehalt der Augenlinse.

Seit Arnold (1910) fand, dass die Cysteinreaktion der Augenlinse stark positiv ausfällt, hat man zusammenhängend mit der Entstehung des Katarakts dem Cysteingehalt der Augenlinse eine grosse Aufmerksamkeit zugewandt.

Reis (1911) fand, dass bei der Altersstar-Linse die Cysteinreaktion negativ ausfiel. Diese Angabe haben Jess (1913), Goldschmidt (1917), Seki (1926), Shoji (1927) und Cohen, Kamner und Killian (1928) nachgeprüft und bestätigt.

Tassman (1929) und Shoji (1931) haben beim Altersstar und Adams (1930) beim Naphthalinstar das quantitative Verschwinden des freien Cysteins festgestellt und Goldschmidt (1924) fand mittels der Methylenblaumethode ein Verschwinden des Glutathion bei derselben Erkrankung.

Goldschmidt (1917) hat die Reduktionskraft der Rinderlinse bestimmt und indirekt den Cysteingehalt der Linse berechnet, und Tassman (1929) hat den Gesamtcystingehalt der Linse nach der Methode von Folin-Looney bestimmt. Aber eine geeignete

Tabelle V.

Bestimmung des Eiweisses in kataraktösen Kaninchenlinsen (Naphthalin).

Nr.	Gew. des Tieres	Gew. der Linse	Total-eiweiss		A-Fraktion		B-Fraktion		A-Fraktion : B-Fraktion	Beobachtungs-dauer
	g	g	g	%	g	%	g	%		(Tage)
1	2158 2671	0,5483	0,1111	20,26	0,1030	19,33	0,0051	0,93	95,4:4,6	44
2	2005 2655	0,5940	0,1077	18,13	0,1046	17,60	0,0031	0,53	97,1:2,9	44
3	2055 1832	0,4585	0,1278	27,87	0,1195	26,06	0,0083	1,81	94,3:5,7	45
4	4810 1970	0,6340	0,1449	22,85	0,1434	22,62	0,0015	0,23	99,0:1,0	50
5	1940 1960	0,5761	0,1298	22,53	0,1262	21,90	0,0036	0,63	97,3:2,7	50
6	1838 2380	0,5860	0,0927	15,81	0,0859	14,65	0,0068	1,16	92,7:7,3	50
7	2155 2536	0,4130	0,0701	16,98	0,0701	13,98	0	0	100 :0	70
D. S.			0,1130	20,64	0,1080	19,87	0,0040	0,77	95,5:3,5	

Körpergewicht oben: Beginn der Naphthalinfütterung.
unten: Exstirpationszeit.

Untersuchungsmethode zur Bestimmung des gebundenen Cysteins besteht noch nicht.

Neuerdings haben Okuda und Katai (1927, 1929) eine Methode zur Bestimmung des Cystins und Cysteins in Geweben veröffentlicht, und Teruuchi und Okabe (1928) und Yamazaki (1930) haben diese verbessert. Ich habe die Methoden dieser Forscher kombiniert, das freie Cystein, Cystin und das gebundene Cystein, Cystin bestimmt und auf diese Weise die Altersveränderungen und kataraktösen Veränderungen der Linse untersucht.

Bestimmungsmethode.

Die Rinderlinse wurde innerhalb einer Stunde nach der sofortigen Exstirpation des Auges unmittelbar nach dem Schlachten, die Kaninchenlinse sofort nach der Abtötung entnommen und die Menschenlinse sofort nach der Katarakt-Operation untersucht.

Die Bestimmung geschah hauptsächlich nach der Methode von Okuda.

Trennung des Eiweisses. Die gewogene Linse wurde im Glasmörser zerrieben und mit Sulfosalicylsäure versetzt (Rind und normales Kaninchen, 30 ccm 2%; kataraktöse Linse, 15 ccm 3%); bei gleichzeitiger Schwefelbestimmung wurden 15 ccm 10%iger Trichloressigsäure hinzugefügt, weiterhin fein zerrieben, eine Stunde lang stehen gelassen und dann durch einen Jenaglasfilter filtriert. Mit Sulfosalicylsäure (20 ccm 2% od. 15 ccm 3%) oder Trichloressigsäure (15 ccm 10%) wurde der Niederschlag und der Glasmörser ausgewaschen.

Freies Cystein und Cystin. Das Jenaglasfiltrat wurde mittels 2%iger und 4%iger Salzsäure auf 10 ccm (Rind und normales Kaninchen) oder 50 ccm (kataraktöse Linse) aufgefüllt, und unter Anwendung von Azolitmin als Indikator die Acidität bestimmt.

Cystein: Einem konstanten Volum des Filtrates wurde 5*N*. NaOH, 20%ige HCl, 4%ige HCl oder Wasser zugesetzt, sodass die Acidität einer 2%igen Salzsäurelösung gleichkam. Dann wurde mittels 2%iger HCl auf 25 ccm aufgefüllt, ein konstantes Volum aufgemessen und titriert.

Cystin: Es wurde ein konstantes Volum aufgemessen, die Acidität auf 4%iger HCl geregelt, Zinkpulver zugesetzt und 30 Minuten lang der Reduktion ausgesetzt. Weiter wurde filtriert, mit warmem Wasser gewaschen und auf 25 ccm aufgefüllt. Nach Bestimmung der Acidität wurde ein konstantes Volum aufgemessen, die Acidität auf 2%ige HCl eingestellt und mittels 2%iger HCl auf 25 ccm aufgefüllt. Ein konstantes Volum wurde aufgemessen und titriert.

Gebundenes Cystein und Cystin. Der Rückstand des Jenaglasfiltrats wurde sorgfältig gesammelt, mit 10 ccm konzentrierter HCl und 40 ccm 20%iger HCl versetzt und nach Durchleitung mit CO_2 im Wasserbad gelöst, weiter dann unter Durchleitung von CO_2 im Sandbade 5 Stunden lang erhitzt.

Das Hydrolysat wurde filtriert, gewaschen und auf 100 ccm aufgefüllt. Bei der kataraktösen Linse wurde unter Durchleitung von CO_2 auf niedrigem Druck auf 25 ccm konzentriert.

Cystein: Von dem Hydrolysat wurde ein konstantes Volum aufgemessen und nach Regelung der Acidität auf 2%ige HCl mit 2%iger HCl auf 25 ccm aufgefüllt. Bei der Menschenlinse wurde ein Teil auf 10 ccm aufgefüllt. Ein konstantes Volum wurde aufgemessen und titriert.

Cystin: Ein konstantes Volum wurde aufgemessen die Acidität auf 4%ige HCl geregelt, mit Zinkpulver 1 Stunde lang reduziert, 10 Minuten lang Luft durchgeleitet und dann mit neuem Zinkpulver wiederum 30 Minuten lang reduziert.

Okuda hat zur Reduktion des gebundenen Cystins das Hydrolysat mit Tierkohle entfärbt; da aber bei dieser Methode Verluste entstehen, habe ich, wie w.o. dargetan, mittels der Methode von Teruuchi das gebundene Cystin reduziert.

Weiter wurde filtriert, mit warmem Wasser gewaschen, auf ein konstantes Volum aufgefüllt und die Acidität auf 2%ige HCl geregelt. Mit 2%iger HCl wurde dann auf 25 ccm oder 10 ccm aufgefüllt, ein konstantes Volum aufgemessen und titriert.

Titration und Berechnung. Die Titration geschah nach der potentialmetrischen Methode von Yamazaki.

Als Grundregel wurden 5 ccm der Lösung und, wenn der Gehalt zu wenig war, 10 ccm angewendet. Weiter wurden 1 ccm N/10 KJ und 1 ccm 4%ige HCl zugesetzt, und mit einer Lösung von N/100 KJO_3 in 2%ige HCl titriert. Beim Titrieren wurde die Lösung auf 20°C gehalten.

Rein dargestelltes Cystin wurde in HCl gelöst, reduziert und eine 2%ige HCl-Lösung des Cysteins hergestellt. Die Lösungen wurden in verschiedener Konzentration titriert (20°C) und nach der Konzentrationskurve der Cysteingehalt berechnet.

Nach der Reduktion wurde die Summe von Cystin und Cystein als Cystein berechnet, und aus der Differenz zwischen dieser Summe und dem Cysteingehalte durch Multiplikation mit dem Faktor 1.01 (Okuda) der Cysteingehalt berechnet.

Schwefel. Nach Konzentration eines konstanten Volums bei niedrigem Druck (bei der kataraktösen Linse wurde das Hydrolysat unter Durchleitung von CO_2 konzentriert und auf ein konstantes Volum aufgefüllt) wurde das Hydrolysat mit den Benedict'schen

Schwefelreagenz oxydiert, mit $BaCl_2$ der Schwefel als $BaSO_4$ ausgefällt, der Niederschlag mit kaltem Wasser (mit $BaSO_4$ gesättigt) gewaschen, getrocknet, erhitzt und gewogen.

Resultate und Kritik.

In der Regel wurden die Bestimmungen an einer Linse vorgenommen; bei der Kälberlinse, der normalen Kaninchenlinse und einigen Naphthalinstarlinsen wurden die beiden Linsen zusammen zur Bestimmung gebraucht, und die Hälfte der erworbenen Resultate wurde als Durchschnittswert einer Linse berechnet und in der Tabelle angegeben.

Der experimentelle Katarakt wurde nach derselben Methode wie bei der Eiweissbestimmung erzeugt.

Der Cysteingehalt der normalen Linse beträgt, wie die Tabellen VI und VII zeigen: Freies Cystein: Rind 0.12%, Kalb 0.121%, Kaninchen 0.121%. Gebundenes Cystein: Rind 0.864%, Kalb 0.807%, Kaninchen 1.052%.

Der freie Cysteingehalt beträgt nach Adams (1925) beim Rind 0.152%, nach Michael und Vancea (1928) bei Rind, Kaninchen und Katze 0.178%, nach Tassman (1929) beim Schwein 0.148% und nach Shoji (1930) beim Rind 0.133% und beim Kaninchen 0.1%, demnach meine Ergebnisse mit denen früherer Forscher nahe übereinstimmen. (Tassman, Adams und Michael haben zwar das Glutathion bestimmt, ich habe aber ihre Angaben in Cystein umgerechnet.)

Shoji hat in der Linse freies Cystin nicht nachweisen können, und auch mir ist dieser Nachweis nicht gelungen.

Zur Bestimmung des gebundenen Cystins habe ich das Hydrolysat des Niederschlags von Sulfosalicylsäure entweder direkt oder nach Konzentrierung bei niedrigem Druck unter Durchleitung von CO_2 einmal zu Cystein reduziert und das letztere in üblicher Weise zu bestimmen versucht, doch war es mir nicht möglich solches nachzuweisen. Bei meinen Versuchen habe ich mit dem Hydrolysat des Niederschlags von Trichloressigsäure den Cysteingehalt aus dem Schwefelgehalt berechnet, und ein Vergleich mit dem direkt bestimmten Cysteingehalt ergab keinen wesentlichen Unterschied.

Tabelle VI.
Cysteingehalt in normalen Linsen von Kälbern u. Rindern.

Alt.	Gew. der Linse	Cystein (frei)		Cystein (gebunden) gefunden		berechnet	S	Präzipitant
	g	mg	%	mg	%	mg	mg	
20 T.	0,8229	0,98	0,119	6,47	0,786			S. S. A.
40 T.	0,9344	1,08	0,115	7,47	0,799	(7,62)	2,02	T. C. E.
40 T.	0,8830	1,13	0,128	7,40	0,835	(7,43)	1,97	„
	D. S.	1,06	0,121	7,11	0,807	(7,58)	2,00	
6 J.	2,1824	2,43	0,111	16,00	0,733	(17,51)	4,69	T. C. E.
„	2,3992	2,54	0,106	18,70	0,779			S. S. A.
„	2,4786	3,25	0,131	21,49	0,857	(22,38)	5,93	T. C. E.
„	2,4818	3,11	0,125	19,40	0,782	(22,19)	5,88	„
„	2,5584	3,80	0,140	22,87	0,894	(22,00)	5,83	„
7 J.	1,9592	2,86	0,140	20,87	1,000			S. S. A.
„	2,3864	3,32	0,138	22,06	0,924			„
„	2,4914	2,98	0,119	19,90	0,798	(22,12)	5,86	T. C. E.
„	2,5752	3,36	0,130	23,60	0,916			S. S. A.
„	2,6214	3,57	0,136	23,87	0,910			„
8 J.	2,1171	2,55	0,120	16,00	0,755	(18,12)	4,80	T. C. E.
„	2,3984	3,21	0,134	22,13	0,969			S. S. A.
„	2,4592	3,03	0,124	22,26	0,906			„
	D. S.	3,08	0,127	20,66	0,854	(20,72)	5,50	

Nach der Angabe von Tassman beträgt der gesamte Cystingehalt beim Schwein 1.0%, was mit dem gesamten Cysteingehalte in meinen Versuchen nahezu übereinstimmt. Es lässt sich daher denken, dass in der normalen Linse die Reduktionskraft stark ist, sodass das in Cystin umgewandelte Cystein sofort wieder zu Cystein reduziert wird, und dass ein Vorhandensein von gebundenem und freiem Cystin nicht angenommen werden kann.

Goldschmidt (1917) hat zu der Rinderlinse Schwefel hinzugefügt, den entwickelten SH_2 bestimmt, und im Verhältnis zu dem Prozentgehalte des entwickelten SH_2 zum Linseneiweiss die Reduktionskraft der Linse festgestellt und den Cysteingehalt der

Tabelle VII.

Cysteingehalt in normalen Linsen von Kaninchen.

Nr.	Gew. des Körp.	Gew. der Linse	Cystein (frei)		Cystein (gebunden) gefunden		berechnet	S.	Präzipitant
	g	g	mg	%	mg	%	mg	mg	
1	1755	0,4467	0,57	0,128	5,10	1,141			S. S. A.
2	1850	0,4278	0,54	0,125	4,71	1,100			„
3	2800	0,6108	0,70	0,112	5,74	0,939			„
4	2190	0,5843	0,70	0,121	5,97	1,022			„
5	2150	0,4217	0,54	0,128	4,71	1,117	(4,22)	1,12	T. C. E.
6	2370	0 4353	0,54	0,124	4,71	1,082	(4,69)	1,24	„
7	2100	0,5823	0,63	0,108	5,51	0,946	(5,70)	1,51	„
8	2000	0,4392	0,54	0,123	4,71	1,071	(5,00)	1,33	„
	D. S.	0,4935	0,60	0,121	5,15	1,052	(4,90)	1,30	

Linse berechnet. Dabei fand er, dass Reduktionskraft und Cysteingehalt der Linse zum Alter umgekehrt proportional sind. Seki (1926) hingegen hat nachgewiesen, dass die Cysteinreaktion der Augenlinse keine Altersveränderungen zeigt. Auch meine Untersuchungen haben dasselbe Ergebnis erbracht, nämlich, dass der Cysteingehalt keine grossen Altersveränderungen zeigt, sodass auch für mich die Angabe von Goldschmidt nicht annehmbar ist.

Adams (1925) hat mittels der Methylenblaumethode und Respirometermessung gefunden, dass das β-Krystallin auf die Cysteinreaktion stark positiv reagiert, zwar eine Reduktionskraft nicht besitzt, aber die Reduktionskraft des Glutathion aktiviert; schliesslich fand er, dass anderes Linseneiweiss diese Funktion nicht hat. Nach meinen Untersuchungen beträgt der β-Kristallingehalt 1 (beim Kalb), 1.59 (beim Rinde); nach der Angabe von Goldschmidt beträgt der entwickelte SH_2 Gehalt 1 (beim Kalb) : 1.41 (beim Rinde); d. h. also, dass die Altersvermehrung des SH_2 mit der des β-Kristallins übereinstimmt. Demnach lässt sich wohl denken, dass es sich bei der Angabe von Goldschmidt um das β-Kristallin handelt; dass also die Reduktionskraft der Linse zu dem Alter in einem umgekehrten Verhältnisse steht, und dass es

sich nicht um das Verhältnis des Gesamtcysteingehalts zu dem Alter handelt.

Über den Cysteingehalt der verschiedenen Eiweisskörper der Linse hat Jess (1913) Untersuchungen angestellt, aus denen sich ergab, dass die Cysteinreaktion beim Albumoide negativ, beim α-Kristallin einfach positiv und beim β-Kristallin stark positiv ausfiel, woraus er schloss, dass das Albumoid kein Cystein enthält. Adams (1925) und Shoji (1927) haben diese Untersuchungen nachgeprüft und deren Ergebnisse bestätigt.

Okuda (1929) fand, dass bei der Eiweissdarstellung sich das Cystein verändert und verloren geht, wie er durch quantitative Bestimmungen nachwies. Ich habe bei meinen Versuchen mit dem Naphthalinstar bei der Linse der einen Seite das Eiweiss (Tabelle V Nr. 1–7) und bei der Linse der anderen Seite das Cystein (Tabelle IX Nr. 6–12) bestimmt. Ein Vergleich der Tabellen zeigt, dass, trotzdem das β-Krystallin verschwunden war, ziemlich viel Cystein übrig blieb. Daraus ist zu schliessen, dass natürlich das α-Krystallin Cystein enthält; dass das Albumoid kein Cystein enthält, kann daraus nicht gefolgert werden. Trotzdem denke ich mir, dass auch das Albumoid verändert wurde, und daher auf die qualitative Reaktion nicht mehr reagierte. Auch beim β-Kristallin wird zwar ein Teil Cystein auf diese Weise verloren gehen, aber da es an Cystein sehr reich ist, fällt die qualitative Reaktion sehr stark aus.

Die an der kataraktösen Linse erhobenen Resultate sind in den Tabellen VIII, IX und X dargestellt.

Im Vergleich zu der normalen Kaninchenlinse fand ich also, ebenso wie Adams beim Naphthalinstar und Shoji und Tassman beim Altersstar, dass bei der kataraktösen Linse das freie Cystein stark vermindert ist. Nach den erhaltenen Ergebnissen bei der Naphthalinstarlinse Nr. 6 und der Menschenstarlinse Nr. 4 ist anzunehmen, dass das freie Cystein einmal in Cystin umgewandelt wird und dann verschwindet. Ich habe weiter gefunden, dass bei der kataraktösen Linse das gebundene Cystein stark vermindert, und das gebundene Cystin nachweisbar ist. Auch der Schwefel ist vermindert, aber im Vergleich zu dem Grade der Verminderung

Tabelle VIII.

Cystein- u. Cystingehalt in kataraktösen Linsen von Kaninchen (Massage).

Nr.	Gew. des Körp.	Gew. der Linse	(Frei) Cystein	(Gebunden) Cystein gefunden	berechnet	Cystin	S	Beobachtungsdauer
	g	g	mg %	mg %	mg	mg %	mg	
1	2484	*0,5847	0	3,54 0,605	(4,08)		1,08	5 T.
		0,4037	0,54 0,131	5,10 1,263	(5,32)		1,41	
2	2365	*0,5405	0	3,54 0,654	(3,96)		1,05	6 T.
		0,4390	0,54 0,123	5,10 1,161	(5,29)		1,40	
3	2605	*0,5177	0	2,00 0,385				6 T.
		0,4423	0,54 0,121	5,10 1,153				
4	2530	*0,6277	0	1,84 0,271	(3,96)	1,09 0,173	1,05	32 T.
		0,4647	0,60 0,130	5,55 1,194	(5,13)		1,36	
5	2830	*0,7326	0	2,30 0,315	(3,88)	1,25 0,171	1,03	33 T.
		0,5410	0,63 0,117	6,00 1,109	(6,11)		1,62	
6	2555	*0,7426	0,07 0,009	3,92 0,527	(4,37)	0	1,16	40 T.
		0,5805	0,63 0,104	5,33 0,901	(5,96)		1,58	
7	2640	*0,5954	0	1,32 0,222	(5,17)	0,93 0,156	1,37	41 T.
		0,4702	0,58 0,123	6,53 1,388	(6,98)		1,85	
8	3005	*0,6965	0	1,75 0,251	(3,69)	1,75 0,250	0,98	42 T.
		0,5313	0,60 0,113	6,22 1,171	(6,07)		1,61	

* kataraktöse Linse.

des gebundenen Cysteins ist der Grad der Verminderung nur ein geringer. Aus der Angabe von Tassman, nach der bei der Altersstarlinse der Verminderungsgrad des Gesamtcystins gering ist, ist anzunehmen, dass das gebundene Cystein zum Teil verschwindet, zum grossen Teil aber in Cystin und andere Schwefelverbindungen umgewandelt wird.

Jess hat aus der Tatsache, dass beim Altersstar die Cysteinreaktion verschwindet, vermutet, dass das β-Kristallin austritt oder umgewandelt wird. Nach meinen Versuchsresultaten ist anzunehmen, dass ganz allgemein bei Katarakt das freie Cystein einmal in Cystin umgewandelt wird und dann verschwindet, andererseits in dem β-Kristallin Veränderungen hervorgerufen werden, durch die dessen Stickstoff und ein Teil des Cysteins verschwinden und in andere Eiweisskörper, wahrscheinlich α-Kristallin und Albumoid, umgewandelt werden. Jedenfalls ist verständlich, dass das gebundene Cystein in Cystin und andere Schwefelverbindungen

TABELLE IX.

Cystein- u. Cystingehalt in kataraktösen Linsen von Kaninchen. (Naphthalin).

Nr.	Gew. des Körp.	Gew. der Linse	(Frei) Cystein		(Frei) Cystin		(Gebunden) Cystein gefunden		(Gebunden) Cystein berechnet	(Gebunden) Cystin		S	Präzipitant	Beobachtungsdauer
	g	g	mg	%	mg	%	mg	%	mg	mg	%	mg		
1	2290 1250	0,4827	0,54	0,112			5,11	1,058					T. C. E.	3 T.
2	2200 1755	0,5624	0,45	0,080			5,11	0,902					„	„
3	1880 1250	0,4485	0,34	0,073			5,11	1,137					„	6 T.
4	2400 2300	0,6017	0				3,46	0,575	(4,31)	0		1,14	„	21 T.
5	1805 1695	0,6110	„				3,00	0,490	(4,04)	„		1,07	„	„
6	2158 2671	0,5562	0,16	0,028	0,16	0,028	1,05	0,188		1,39	5,250		S. S. A.	44 T.
7	2005 2655	0,5925	0				1,32	0,222	(4,38)	1,04	0,176	1,16	T. C. E.	„
8	2055 1832	0,4548	„				1,29	0,283	(4,76)	1,10	0,246	1,26	„	45 T.
9	1810 1970	0,6306	„		0		1,65	0,261		1,39	0,220		S. S. A.	50 T.
10	1940 1960	0,5609	„				1,75	0,312	(5,21)	1,92	0,342	1,38	T. C. E.	„
11	1838 2380	0,5780	„		„		0,70	0,121		1,68	0,291		S. S. A.	„
12	2155 2136	0,4130	„		„		1,20	0,290		0,41	0,099		„	70 T.

Körpergewicht oben: Beginn der Naphthalinfütterung.
unten: Exstirpationszeit.

Tabelle X.

Cystein- u. Cystingehalt in kataraktösen Linsen von Menschen.

Nr.	Name	Alt.	Gew. der Linse	(Frei) Cystin	(Gebunden) Cystein gefunden	(Gebunden) Cystein berechnet	(Gebunden) Cystin	S	Präzipitant	Beschaffenheit der Linse
			g	mg %	mg %	mg	mg %	mg		
1	H. K. ♀	49 J.	0,2395		0,20 0,083		0,30 0,125		T. C. E.	Cataracta senilis matura Totallinse
2	T. B. ♂	40 J.	0,1270		0,23 0,181	(1,33)	0,26 0,204	0,353	„	Cataracta senilis matura Kern
3	K. H. ♂	40 J.	0,1769		0,25 0,141	(1,89)	0,14 0,079	0,501	„	Glasbläser-Kataract matura Totallinse
4	T. M. ♂	61 J.	0,0975	0,096 0,099	0,11 0,115		0,23 0,237		S. S. A.	Cataracta glaucomatosa matura Kern
5	W. U. ♂	68 J.	0,1384	0	0,63 0,451		0,23 0,166		„	Cataracta complicata immatura Kern
6	S. M. ♂	41 J.	0,1352	0	0		0,23 9,164		„	Cataracta complicata matura Kern

umgewandelt wird. Damit habe ich also die Vermutung von Jess bezüglich des Verschwindens der Cysteinreaktion in der kataraktösen Linse voll bestätigen können.

III. Der Isoelektrische Punkt des α-Kristallins und die Wirkung des Ca auf dasselbe.

Zur Erforschung der Entstehungsweise der Linsentrübung ist die Erforschung der Trübungsweise des Linseneiweisses, das einen grossen Teil der festen Bestandteile der Linse einschliesst, von der grössten Bedeutung. Ich habe festgestellt, dass bei der kataraktösen Linse das β-Kristallin sich verändert und verschwindet, das α-Kristallin und das Albumoid aber vermehrt werden; daher habe ich die Trübungsweise des α-Kristallins festzustellen gesucht und zu diesem Zwecke die isoelektrischen Erscheinungen des α-Kristallins und den Einfluss des K, Na und β-Kristallins und den Einfluss des K-, Na-Salzes und β-Kristallins bestimmt.

Burge (1909) hat bei der Altersstarlinse eine Vermehrung des Ca, Na und Mg und eine Verminderung des K festgestellt, Adams (1929) fand eine Vermehrung des Ca und eine Verminderung des K, Salit (1930) eine Vermehrung des Ca, Ashikaga (1925) stellte histochemisch die Verminderung des K fest; es ist daher von besonderem Interesse festzustellen, welche Beziehungen zwischen Elektrolyt und Katarakt bestehen.

Über die Wirkung von Ca-Salzen auf die frische Tierlinse haben Stoeltzner (1906), Nelson (1925) und Adams (1929) Untersuchungen angestellt, wobei sie festgestellt haben, dass eine Linsentrübung durch Applikation von Ca-Salzen erst dann eintritt, wenn die Konzentration derselben höher ist als die der kataraktösen Linse. Adams hat den Einfluss von Ca auf die α- und β-Kristallinlösungen untersucht und gefunden, dass die α-Kristallinlösung proportional der Ca-Menge getrübt wird, und dass eine α- β-Kristallinlösung bei Vorhandensein von Ca sich trübt. Bezüglich der Ca-Konzentration hat sie leider keine genauen Angaben gemacht. Um nun die Beziehungen zwischen dem Ca und der Entstehung des Kataraktes genauer festzustellen, habe ich die Wirkung des Ca auf das α-Kristallin eingehend untersucht.

Darstellung der Eiweisslösung.

Zur physikalisch-chemischen Untersuchung ist es natürlich wünschenswert das Eiweiss in einem den rohen Zustande annähernd gleichen Zustande zu erhalten. Ich habe deshalb ohne Anwendung irgendwelcher Mittel mittels Ultrafeinfilter (nach Zygmondy) auf die w.u. beschriebene Weise das Eiweiss getrennt und eine Eiweisslösung, deren Ph nahezu neutral ist, hergestellt.

Die Rinderlinse wurde mit CO_2-freiem Wasser zerrieben, mittels der Schüttelmaschine 30 Minuten lang geschüttelt, Toluol zugesetzt, über Nacht in der Eiskammer stehen gelassen und am anderen Tage zentrifugiert. Danach wurde die überstehende Flüssigkeit durch Kieselgur filtriert und so ein schwach opalisierendes Filtrat erhalten. Das Filtrat wurde dann durch den Ultrafeinfilter (4–6°) filtriert. Dieses Filtrat enthält fast gar kein α-Kristallin; denn es stellt sich mit Essigsäure fast gar keine Trübung ein. Es wurde dann nochmals durch den Ultrafeinfilter (12–15°) filtriert, und dieses Fltrat als β'-Lösung benützt. In dieser Lösung sind ausser β-Kristallin auch Albumin und andere lösliche Bestandteile vorhanden.

Nach Dialysierung der β'-Lösung während einer Woche wurde sie als β-Kristallinlösung angesehen.

Der Rückstand auf dem Ultrafeinfilter wurde mit CO_2-freiem Wasser mehrmals gewaschen, und die Lösung, obgleich sie noch kleine Mengen β-Kristallin enthält, als α-Kristallinlösung angesehen. Diese Eiweisslösungen wurden nach Zusatz von Toluol in der Eiskammer aufbewahrt.

Versuche.

Versuch 1: Zu der β'-Lösung von verschiedener Konzentration wurde ein konstantes Volum der α-Kristallinlösung hinzugefügt, und so α-β'-Lösungen erhalten. Dann wurden die Lösungen in je 2 Reagenzgläser eingefüllt, und zu dem einen Gläschen mittels Mikrobürette tropfenweise N/100 Essigsäure in einer Menge zugefügt, die zur Maximumpräzipitation nötig ist. Die festgestellte Essigsäure-Menge wurde dann tropfenweise auch zu der anderen

Röhre zugegeben und nach 30 Minuten langem Stillstehen zentrifugiert. Die Ph der überstehenden Flüssigkeit wurde mit dem Resultat des Indikatorversuchs verglichen und dann mittels der Chinhydronkettenmethode gemessen.

Wie die Tabelle XI zeigt, wird mit höherer Konzentration der β'-Lösung der isoelektrische Punkt des α-Kristallins nach der sauren Seite verschoben; d. h. es ist wahrscheinlich, dass der isoelektrische Punkt des α-Kristallins durch eine in der β'-Lösung enthaltene Substanz nach der sauren Seite verschoben wird. Um diese Frage noch weiter zu untersuchen, habe ich den nachstehenden Versuch unternommen.

Tabelle XI.

Einfluss der β'-Lösung auf den isoelektrischen Pt. des α-Kristallins.

$\alpha : \beta' :$ Aq	Für maximale Trübung nötige M/100 CH_3COOH	Ph 18°C
	ccm	
1,0 :9,0	0,05	6,93
1,0:0,5:8,5	0,1	6,74
1,0:1,0:8,0	0,125	5,94
1,0:2,0:7,0	0,175	5,56
1,0:5,0:4,0	0,3	5,39
1,0:9,0	0,475	5,26

Versuch 2: Nachdem zu 10 ccm Eiweisslösung verschiedene Volumen CO_2-freies Wasser hinzugefügt worden waren, wurde unter leichtem Schütteln N/100 oder N/200 Essigsäure mittels Mikrobürette tropfenweise hinzugegeben, sodann das Gesamt-Volum auf 11 ccm geregelt. Nach 30 Minuten wurde die Trübung mittels des Nephelometers gemessen, und nach der Gasketten-methode die Ph festgestellt. 100 wurde durch den durch die Nephelometermessung erhaltenen Wert dividiert, und daraus der Trübungsgrad berechnet.

Der isoelektrische Punkt der α-Kristallinlösung (α 0.02%, β 0.005%) ist in der Tabelle XII mit Ph 6.37–6.20 angegeben. Diesen Wert habe ich als den isoelektrischen Punkt des α-Kristallins betrachtet und den folgenden Versuchen zugrunde gelegt. Wie die

Tabelle XII zeigt, hat der isoelektrische Punkt der Mischung von α-Kristallinlösung und β'-Lösung (α 0.02%, β 0.01%) die Ph 5.56–5.46. Da in diesem Falle eine grosse Menge Essigsäure nötig war, habe ich vorläufig der Eiweissmischung eine kleine Menge N/100 Essigsäure zugesetzt.

Tabelle XII.

Isoelektrischer Pt. (α-Kristallinlösung, α-β'-Mischung).

α-Kristallinlösung				α-β'-Mischung			
M/200 CH_3COOH	Aq	Ph 15°C	Trübg.	M/100 CH_3COOH	Aq	Ph 15°C	Trübg.
ccm	ccm			ccm	ccm		
0,1	0,9	7,17	3,2	0,075	0,925	6,33	9,3
0,125	0,875	7,03	5,9	0,15	0,85	6,04	12,5
0,15	0,85	6,80	15,4	0,225	0,775	5,84	14,7
0,175	0,825	6,60	18,5	0,3	0,7	5,70	18,2
0,2	0,8	6,37	19,6	0,375	0,625	5,56	19,6
0,225	0,775	6,20	19,6	0,45	0,55	5,46	19,6
0,25	0,75	6,04	18,2	0,525	0,475	5,36	19,2
0,275	0,725	5,84	17,5	0,6	0,4	5,26	18,8
0,3	0,7	5,63	16,6	0,675	0,325	5,18	16,4
0,325	0,675	5,53	15,2	0,75	0,25	5,12	15,7

Der isoelektrische Punkt der Mischung des α-Kristallins und des β-Kristallins ist in der Tabelle XIII angegeben.

In der Mischung A (α 0.02%, β 0.02%) beträgt Ph 6.22 und in der Mischung B (α 0.02%, β 0.1%) Ph 6.04.

Der isoelektrische Punkt der α-Kristallinlösung (α 0.02%, β 0.005%) betrug, wie die Tabelle XIV zeigt, nach Zusatz von M/40 NaCl oder KCl Ph 5.25–5.19(KCl) und 5.25–5.16 (NaCl).

Der isoelektrische Punkt der Mischung von α-Kristallin, β-Kristallin und M 40 KCl oder NaCl (α 0.02%, β 0.05%) betrug, wie die Tabelle XV zeigt, Ph 5.14–5.05(KCl) und 5.17–5.07(NaCl).

Fassen wir die oben beschriebenen Resultate zusammen, so ergibt sich, dass (Fig. 1) bei Vorhandensein von K- und Na-Salz der isoelektrische Punkt nach der sauren Seite hin verschoben wird.

Tabelle XIII.
Isoelektrischer Pt. (α-β-Mischung).

Mischung A α 0,02% β 0,02%				Mischung B α 0,02% β 0,1%			
M/100 CH_3COOH	Aq	Ph 15°C	Trübg.	M/100 CH_3COOH	Aq	Ph 15°C	Trübg.
ccm	ccm			ccm	ccm		
0,05	0,95	6,98	5,5	0,175	0,825	6,44	12,8
0,075	0,925	6,75	6,5	0,2	0,8	6,34	15,1
0,1	0,9	6,58	14,5	0,25	0,75	6,24	18,5
0,125	0,875	6,42	18,8	0,3	0,7	6,04	19,2
0,15	0,85	6,22	19,6	0,35	0,65	5,81	18,5
0,175	0,825	6,00	16,4	0,4	0,6	5,68	17,5
0,2	0,8	5,88	15,6	0,45	0,55	5,52	17,2
0,225	0,775	5,62	14,4	0,5	0,5	5,33	16,1

Tabelle XIV.
Isoelektrischer Pt. (α-KCl-Mischung, α-NaCl-Mischung).

		KCl		NaCl	
M/200 CH_3COOH	Aq	Ph 17°C	Trübg.	Ph 17°C	Trübg.
ccm	ccm				
0,875	0,125	5,64	13,8	5,70	13,5
0,85	0,15	5,45	16,1	5,48	15,8
0,825	0,175	5,33	17,2	5,39	17,8
0,8	0,2	5,25	19,2	5,25	19,2
0,775	0,225	5,19	19,4	5,16	19,2
0,75	0,25	5,10	18,1	5,08	18,0
0,725	0,275	5,05	17,2	5,03	16,6
0,7	0,3	5,00	15,3	4,95	15,4

Es ist aber nicht zu leugnen, dass dasselbe, wenn auch in geringerem Grad, auch bei dem β-Kristallin der Fall ist.

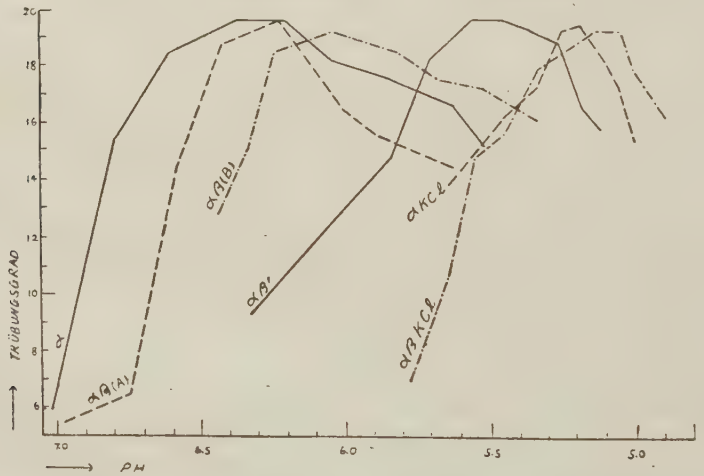
Versuch 3: Um die Einwirkung des Ca auf das α-Kristallin festzustellen, habe ich den folgenden Versuch angestellt:

Zu 5 ccm der Eiweisslösung wurden 5 ccm Salzlösung in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt, nach 30 Minuten der

Tabelle XV.
Isoelektrischer Pt. (α-β-KCl-Mischung, α-β-NaCl-Mischung).

KCl				NaCl			
M/100 CH_3COOH	Aq	Ph 17° C	Trübg.	M/100 CH_3COOH	Aq	Ph 17° C	Trübg.
ccm	ccm			ccm	ccm		
0,125	0,875	5,78	7,0	0,15	0,85	5,87	11,2
0,15	0,85	5,64	10,8	0,2	0,8	5,55	16,2
0,175	0,825	5,55	14,7	0,25	0,75	5,30	18,0
0,2	0,8	5,45	15,6	0,3	0,7	5,17	19,6
0,25	0,75	5,33	17,8	0,35	0,65	5,07	19,6
0,3	0,7	5,14	19,2	0,4	0,6	4,98	17,9
0,35	0,65	5,05	19,2	0,45	0,55	4,90	17,3
0,4	0,6	5,00	17,8	0,5	0,5	4,86	15,9
0,45	0,55	4,89	16,1	0,55	0,45	4,79	14,9

Fig. 1. Isoelektrischer Pt. des α-Kristallins.



Trübungsgrad bestimmt und nach der Gaskettenemethode die Ph festgestellt.

Bei Hinzufügung von $CaCl_2$ α-Kristallinlösung erreicht, wie die Tabelle XVI und Fig. 2 zeigen, die Trübung bei einer Endkonzentration von M/160 das Maximum. Bei der Lösung D habe

ich die gefällte Eiweissmenge bestimmt und festgestellt, dass durch Zusatz von $CaCl_2$-Lösung nicht die Gesamtmenge des α-Kristallins ausgefällt wird.

Tabelle XVI.

Ca Wirkung auf die α-Kristallinlösung.

$CaCl_2$ Endkonzent.	Lösg. A		Lösg. B	Lösg. C	Lösg. D
	Ph 15°C	Trübg.	Ph 15°C	Ph 15°C	präzipitiertes Eiweiss
					mg
1 M/20	6,77	4,0	6,49	6,09	2,72
2 M/40	6,83	5,3	6,57	6,23	3,79
3 M/80	6,91	7,5	6,64	6,42	4,75
4 M/160	7,00	8,4	6,73	6,53	5,93
5 M/320	7,07	7,6	6,76	6,60	5,15
6 M/640	7,12	3,8	6,85	6,65	3,97
7 M/1280	7,18	3,5	6,95	6,70	2,54
8 M/2560			7,02	6,74	1,04
K	7,26	3,3	7,12	6,89	

Lösg. A) α 0,08%, β 0,02%.
Lösg. B) α 0,12%, β 0,03%.
Lösg. C) α 0,48%, β 0,12%.
Lösg. D) α 0,24%, β 0,06%.

Bei der Mischung von α-Kristallinlösung und β'-Lösung erreicht die Trübung (Tabelle XVII, Figur 2) bei Zusatz von $CaCl_2$ M/80 das Maximum, aber diese Trübung ist deutlich leichter als bei der α-Kristallinlösung.

Um die Wirkung von K und Na auf das α-Kristallin festzustellen, habe ich der α-Kristallinlösung KCl und NaCl hinzugefügt, doch tritt, wie die Tabelle XVIII zeigt, keine deutliche Veränderung in dem Trübungsgrade ein.

Bei der Mischung von α-Kristallin und β-Kristallin erreicht nach Zusatz von $CaCl_2$ M/160 die Trübung das Maximum. Aber diese Trübung ist auch hier schwächer als bei der α-Kristallinlösung.

Tabelle XVII.

Ca Wirkung auf die α-β'-Mischung.

$CaCl_2$ Endkonzent.	Lösg. A		Lösg. B
	Ph 15°C	Trübg.	Trübg.
1 M/20	7,01	6,5	8,3
2 M/40	7,07	6,7	8,7
3 M/80	7,12	6,8	9,1
4 M/160	7,17	6,0	6,9
5 M/320	7,22	4,5	4,8
6 M/640	7,29	3,7	4,1
7 M/1280			4,0
8 M/2560			3,9
K	7,38	3,4	3,7

Lösg. A) α 0,12%, β 0,15%.
Lösg. B) α 0,24%, β 0,3%.

Tabelle XVIII.

K und Na Wirkung auf die α-Kristallinlösung.

KCl od NaCl Endkonzent.	Lösung A				Lösung B			
	KCl		NaCl		KCl		NaCl	
	Ph 15°C	Trübg.	Ph 15°C	Trübg.	Ph 16°C	Trübg.	Ph 16°C	Trübg.
M/10	6,62	3,0	6,65	3,0	6,74	3,6	6,71	3,7
M/20	6,69	„	6,70	„	6,84	3,7	6,76	„
M/40	6,81	„	6,76	„	6,91	3,6	6,82	„
M/80	6,89	3,1	6,84	„	6,99	3,7	6,89	„
M/160	6,95	3,0	6,89	„	7,02	„	6,95	„
M/320	7,02	3,1	7,03	„	7,06	„	7,02	„
M/640	7,07	3,0	7,07	„	7,08	„	7,08	„
M/1280	7,12	„	7,14	„	7,12	„	7,11	„
K	7,28	„	7,25	„	7,35	„	7,33	„

Lösg. A) α 0,04%, β 0,01%.
Lösg. B) α 0,2%, β 0,05%.

Fig. 2(A). Ca Wirkung auf die α-Kristallinlösung.
(Lösg. D in Tab.XVI).

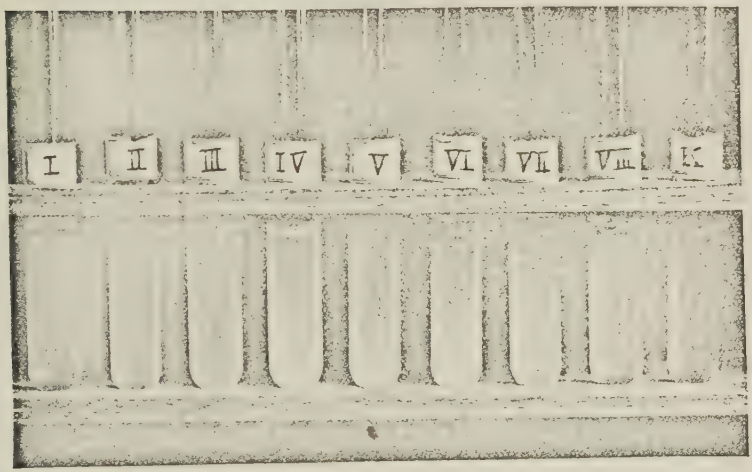
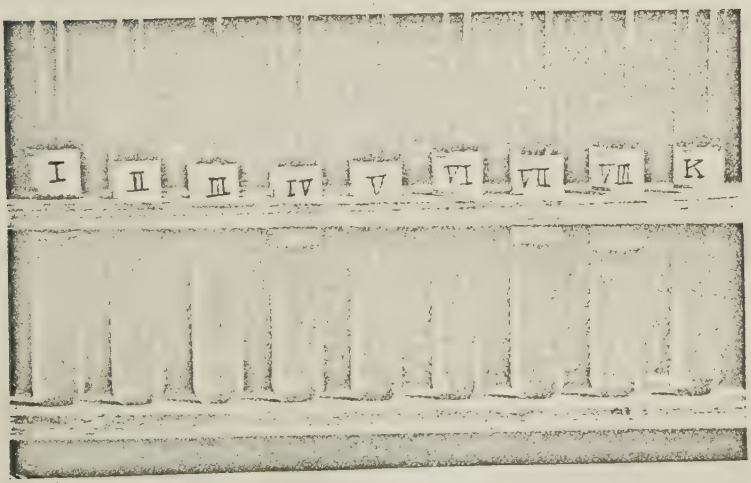


Fig. 2(B). Ca Wirkung auf die α-β'-Mischung.
(Lösg. B in Tab. XVII.)



Bei Hinzufügung von $CaCl_2$ zu einer Mischung von α-Kristallinlösung und M/20 KCl oder NaCl bei M/80 $CaCl_2$ tritt ein Maximum der Trübung auf, doch ist diese bedeutend schwächer als im Falle der α-Kristallinlösung.

Wurde der gleichgerichtete Versuch mit einer Mischung von α-Kristallin, β-Kristallin und M/20 KCl oder NaCl vorgenommen, dann war die Trübung schwächer als in dem vorgenannten Versuch.

Tabelle XIX.

Ca Wirkung auf die α-β-Mischung, α-KCl-Mischung, α-NaCl-Mischung und α-β-KCl- od. NaCl-Mischung.

$CaCl_2$ Endkonzent.	α-β		α-KCl		α-NaCl		α-β-KCl		α-β-NaCl	
	Ph 15°C	Trübg.	Ph 18°C	Trübg.	Ph 18°C	Trübg.	Ph 18°C	Trübg.	Ph 18°C	Trübg.
M/20	6,83	3,0	6,25	4,1	6,27	4,2	6,56	3,4	6,45	3,4
M/40	6,86	5,0	6,33	4,4	6,37	4,6	6,61	3,6	6,57	3,7
M/80	6,89	7,0	6,44	5,0	6,44	5,0	6,64	3,7	6,60	3,7
M/160	6,93	7,4	6,52	4,6	6,55	4,4	6,68	3,5	6,65	3,5
M/320	6,98	6,6	6,56	4,2	6,58	3,8	6,71	3,3	6,71	3,2
M/640	7,02	3,7	6,63	3,8	6,64	3,4	6,75	3,2	6,78	3,1
K	7,16	3,5	6,77	3,3	6,77	3,3	6,80	3,1	6,81	3,1

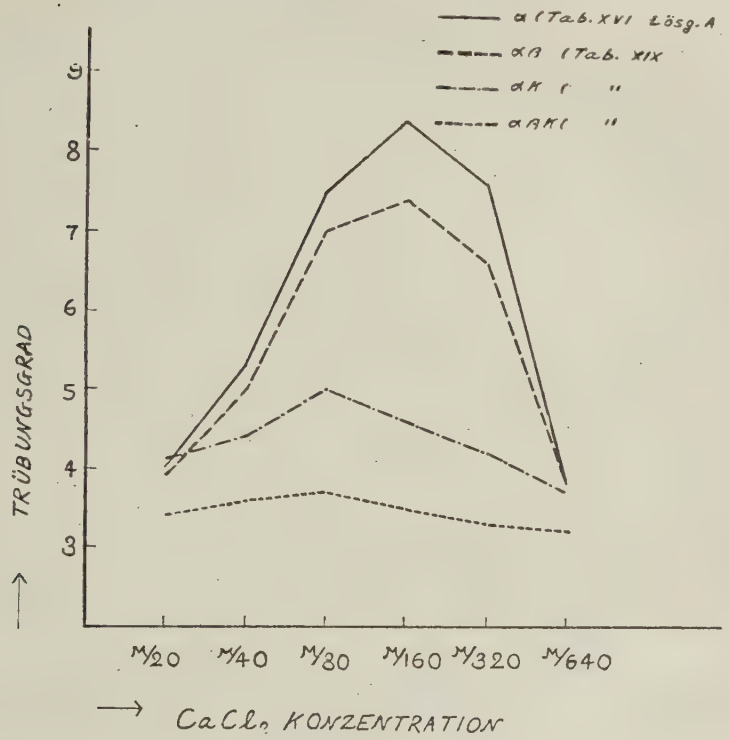
α-β-Mischung	α 0,08%	β 0,1%	
α- K-, Na-Mischung	α 0,08%	β 0,02%	M/20 Na. K.
α- β- K-, Na-Mischung	α 0,08%	β 0,1%	M/20 Na. K.

Fassen wir die obigen Versuchsergebnisse zusammen, so ergibt sich, dass wie die Figur 3 zeigt, der Trübungsgrad des α-Kristallins durch $CaCl_2$, durch Na, K oder β-Kristallin vermindert wird.

Kritik.

Gullotta (1926) untersuchte den Quellungsgrad der Augenlinse und fand Ph 4.0 als isoelektrischen Punkt der Augenlinse. Scalinci (1929) hat die Versuche von Gullotta nachgeprüft und fand den isoelektrischen Punkt bei Ph 4.5 für den Kern und bei 3.5–4.0 für die Rinde. Burky und Wood (1927) haben einer Linsenemulsion, aus der das Albumoid ausgeschieden war, Essig-

Fig. 3. Ca Wirkung auf die α-Kristallinlösung.



säure zugesetzt und die Ph bei einer Maximumpräzipitation des α-Kristallins gemessen. Sie fanden, dass der isoelektrische Punkt des α-Kristallins bei Ph 5.0–4.8 liegt, doch kann ich mich dieser Angabe nicht anschliessen. Nach meinen Resultaten ist der eigentliche isoelektrische Punkt des α-Kristallins im Vergleich zu dem der normalen Linse mehr alkalisch und wird durch Einfluss von K, Na oder β-Kristallin nach den sauren Seite verschoben.

Die nach Hinzufügung von $CaCl_2$ zu α-Kristallinlösung entstehende Trübung scheint ebenso stark zu sein wie bei Hinzufügung von Essigsäure, aber bei Hinzufügung von $CaCl_2$ zu α-Kristallin ist die Fällung nicht vollständig. Auch der Einfluss von K, Na und β-Kristallin ist verschieden; diese Substanzen wirken gegenüber dem Ca antagonistisch, sie hindern die Entstehung der

Trübung des α-Kristallins. Ich denke ausserdem, dass bei der normalen Linse K, Na und β-Kristallin die Trübung des Eiweisses durch Ca erschweren. Da weiter bei meinen Versuchen bei einer Konzentration von $CaCl_2$ M/160 das α-Kristallin ad maximum getrübt wurde, so kann ich wohl schliessen, dass das α-Kristallin bei einer Konzentration des Ca, die der der kataraktösen Linse nahe kommt, (Ca-Gehalt der kataraktösen Linse nach Adams 0.0653%) getrübt wird.

Natürlich wäre es unrichtig, die in vitro erhaltenen Ergebnisse unbedingt in der gleichen Weise auf die Verhältnisse in vivo anzuwenden; auch dürfen wir die von Burge festgestellte Tatsache, dass bei der Linse des Altersstars der Na-Gehalt vermehrt ist, nicht ausser Acht lassen. Nach den Ergebnissen meiner Versuche jedenfalls möchte ich die Entstehung des Katarakts wie folgt erklären: Bei der normalen Linse ist der normale Gehalt an Na, K und β-Kristallin vorhanden, sodass der isoelektrische Punkt immer sauer gehalten, die Wirkung des Ca gehindert und die Linse klar gehalten wird. Bei der kataraktösen Linse aber wird infolge Verminderung des K und des β-Kristallins die den isoelektrischen Punkt des α-Kristallins sauer haltende Wirkung und die hindernde Wirkung auf das Ca vermindert, andererseits werden das α-Kristallin, das Albumoid und Ca vermehrt, und infolgedessen tritt Trübung der Linse auf.

Die Untersuchungsresultate von Nogami (1930), wonach dem Alter proportional der isoelektrische Punkt des Kerns der Rinderlinse nach der sauren Seite, und der der Rinde nach der alkalischen Seite, und ferner die Ph der Rinde wie des Kerns proportional nach der sauren Seite hin verschoben werden, stützen meine Vermutungen. Weiter hat Nogami (1931) gefunden, dass proportional dem Alter eine Wanderung von Na, Ca und Mg in den Kern stattfindet, während K in die Rinde wandert, Ergebnisse, die er für die Erforschung der Kataraktentstehung von grosser Bedeutung hielt. Weitere Forschungen über die Beziehungen zwischen Elektrolyten und Kataraktenstehung werden in Zukunft unbedingt notwendig sein.

Zusammenfassung.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen kann ich kurzgefasst wie folgt widergeben:

1. Bei der normalen Rinderlinse wird das Linseneiweiss proportional dem Alter vermehrt, aber der Vermehrungsgrad des β-Kristallins ist nur gering und wird mit zunehmendem Alter im Prozentgehalt zu dem Linsengewicht umgekehrt proportional.

2. Bei experimentell-kataraktösen Kaninchenlinsen (Naphthalinstar oder Massagestar) wird das Gesamteiweiss und das β-Kristallin vermindert, während das α-Kristallin und das Albumoid vermehrt werden.

3. Der Prozentgehalt der normalen Rinderlinse an freiem und gebundenem Cystein zeigt keine Altersveränderungen. Die normale Kaninchen- und Rinderlinse enthalten weder freies noch gebundenes Cystin.

4. Bei der experimentell-kataraktösen Kaninchenlinse (Naphthalinstar oder Massagestar) und bei der kataraktösen Linse des Meschen ist das Cystein vermindert, und es tritt gebundenes Cystin auf.

5. Der isoelektrische Punkt des α-Kristallins ist mehr alkalisch als bei der normalen Linse und hält sich infolge des Einflusses von K, Na und β-Kristallin mehr nach der sauren Seite.

6. Ca fällt das α-Kristallin, Na und K dagegen nicht. Bei einer Ca-Konzentration von M/160 wird das α-Kristallin ad maximum gefällt.

Die Wirkung des Ca auf das α-Kristallin wird durch die Gegenwart von K-, Na-Salz und β-Kristallin gehindert.

Am Schlusse dieser Arbeit ist es mir aufrichtiges Bedürfnis meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Prof. K. Kodama und Herrn Prof. Dr. Y. Shoji für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für freundliche Leitung und Durchsicht meines Manuskriptes meinen allerherzlichsten Dank anzusprechen.

LITERATUR.

Adams (1925): Proc. Roy. Soc. Lond., **98**, 224.
Adams (1929): Biochem. Jour., **23**, 902.
Adams (1930): Brit. Jour. Ophth., **14**, 49.
Ashikaga (1925): Nippon Gankagakukai Zasshi, **29**, 1.
Arnold (1910): Z. f. physiol. Chem., **70**, 300.
Burge (1909): Arch. of Ophth., **38**, 435.
Bürger und Schlomka (1927): Z. f. ges. exper. Med., **58**, 710. (Ref. Zentbl. f. ges. Ophth. u. ihre Gr., **20**, 42, 1929.)
Burky und Wood (1927): Jour. of Amer. med. Ass., **89**, 102.
Cahn (1881): Z. f. physiol. Chem., **5**, 214.
Cohen, Kamner und Killian (1928): Proc. Soc. exper. Biol. & Med., **25**, 677. (Ref. Zentbl. f. ges. Ophth. u. ihre Gr., **20**, 733, 1929.)
Goldschmidt(1917): Arch. f. Ophth., **93**, 447.
Goldschmidt (1924): Arch. f. Ophth., **113**, 160.
Gullotta (1926): Arch. di scienze biol., **8**, 48. (Ref. Zentbl. f. Ophth. u. ihre Gr., **16**, 845, 1926.)
Jess (1913): Z. f. Biol., **61**, 93.
Michael und Vancea (1927): Comp. rend. Soc. de Biol., **97**, 1569.
Mörner (1894): Z. f. physiol. Chem., **18**, 61.
Nelson (1922): Kl. Monatbl. Aug., **70**, 641.
Nogami (1930): Chuo ganka iho, **22**, 1065.
Nogami (1931): Zikken ganka zasshi, **14**, 83.
Okuda und Katai (1927): Nippon noogeikagaku kaishi, **3**, 1097.
Okuda und Katai (1929): Nippon noogeikagaku kaishi, **5**, 459.
Reis (1912): Arch. f. Aug., **72**, 156.
Salit (1930): Arch. of Ophth., **61**, 375.
Scalmei (1929): Bull. soc. ital. Biol. sper., **4**, 359. (Ref. Zentbl. f. Ophth. u. ihre Gr., **22**, 264, 1929.)
Seki (1926): Nippon gankagakukai zassi, **30**, 934.
Shoji (1922): Mitt. a. d. med. Fak. d. Kais. Univ. Tokyo, **29**, 61.
Shoji (1927): Annal. d'Ocul., **164**, 343.
Shoji (1931): Arch. d'Opht., **48**, 28.
Stoeltzner (1906): Kinderheil., **7**, 425. (cit. n. Adams zu Biochem. Jour., **23**, 902, 1929.)
Tassman (1928): Arch. of Ophth., **59**, 431.
Teruuchi und Okabe (1928): Jour. of Biochem., **8**, 459.
Yamazaki (1930): Jour. of Biochem., **12**, 207.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

ÜBER DEN EINFLUSS DER FUNKTION DER ENDOKRINEN DRÜSEN AUF DIE ZUCKERAUSSCHEIDUNGSSCHWELLE.

Von

SOITIRO YOKOTA.

(*Aus der med. Universitätsklinik von Prof. Dr. S. Tsunoo, Nagasaki, Japan.*)

(Eingegangen am 15. September 1931)

Einleitung.

I. Einfluss der Funktion der Nebenniere auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

1. Einfluss der Transplantation der Nebennierenrinde auf die Zuckerausscheidungsschwelle.
2. Einfluss der Zerstörung der Nebennierenrinde auf die Zuckerausscheidungsschwelle.
3. Einfluss der Adrenalin-Injektion auf die Zuckerausscheidungsschwelle.
4. Einfluss der Zerstörung des Nebennierenmarks auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

Zusammenfassung.

II. Einfluss der Funktion der Schilddrüse auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

1. Einfluss der Fütterung mit Schilddrüsenpräparat auf die Zuckerausscheidungsschwelle.
2. Einfluss der einmaligen Injektion von Schilddrüsenpräparat auf die Zuckerausscheidungsschwelle.
3. Einfluss der Thyreoidektomie auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

Zusammenfassung.

III. Einfluss der Funktion der Hypophyse auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

1. Einfluss der Hinterlappenstoffe auf die Zuckerausscheidungsschwelle.
2. Einfluss der Vorderlappenstoffe auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

Zusammenfassung.

Literatur.

Einleitung.

Es ist von vielen Seiten nachgewiesen, dass die einzelnen endokrinen Drüsen in den innigsten Wechselbeziehungen zum vegetativen Nervensystem stehen und mit demselben einen geschlossenen Funktionskreis bilden, der einerseits in der sekretorischen Innervation der endokrinen Drüsen, anderseits in der Gleichgewichtserhaltung des vegetativen Nervensystems durch die Hormone zum Ausdruck kommt.

Dass die Nierenschwelle für die Zuckerausscheidung zu der Funktion des vegetativen Nervensystems in sehr inniger Beziehung steht, ist schon von vielen Autoren beobachtet worden; und es wurde mitgeteilt, dass die Zuckerausscheidungsschwelle durch Adrenalin (Nakayama, 1924), durch Atropin (Shim, 1925; Eda, 1927), durch Cholin und Pilocarpin (Eda, 1927), und durch beiderseitige unvollständige Splanchnicotomie, aber nicht bei der vollständigen (Kawashima, 1928, Kawashima & Iwanaga, 1929, Iwanaga, 1930) mehr oder minder deutlich ansteigt, während sie durch Ergotamin (Eda, 1929) und durch beiderseitige Vagotomie (Hildebrandt, 1921; Nakayama, 1924; Shim, 1925; Kawashima & Iwanaga, 1929) herabsteigt. Bei solcher Sachlage liegt der Gedanke nahe, dass die Zuckerausscheidungsschwelle auch zu der Funktion der einzelnen endokrinen Drüsen in inniger Beziehung steht.

Diese Ansicht wurde schon von mehreren Autoren teilweise ausgesprochen. So wurde die Steigerung des Schwellenwertes für Zuckerausscheidung von Bailey (1919) bei Schilddrüsen- bezw. Hypophysenerkrankungen, von Eda (1927) und Lichtwitz (1926) bei Pancreatomie, von Kawashima (1927) bei Fütterung mit Schilddrüsenpräparat und bei Kastration des Hodens, von Pollak (1923) und Nakayama (1924) bei Adrenalininjektion, und von Steinitz (1929), Kempmann und Clauditz (1929), Berghoff (1924), Eda (1927) und Wiechmann (1929) bei Insulininjektion beobachtet, obgleich die letztgenannten zwei Autoren bei einmaligem Insulingebrauch oft eine Herabsetzung des Schwellenwertes ermittelten.

Nun stellte ich auf noch breiterer Basis Untersuchungen an, um den Zusammenhang zwischen der Funktion der endokrinen Drüsen und der Zuckerausscheidungsschwelle kennen zu lernen.

Bei meinen Untersuchungen wurden als Versuchstiere wegen der leichten Katheterisierbarkeit stets männliche Kaninchen benutzt.

Zur Bestimmung der Zuckerausscheidungsschwelle ging ich so vor, dass ich Kaninchen, nachdem sie durch mehrmalige Fütterung mit Zuckerlösung an die zuckerreiche Diät gewöhnt waren und ihre Zuckertoleranz annähernd bestimmt war, 20–24 Stunden ohne Nahrung liess und ihnen dann eine 30%ige Traubenzuckerlösung mit einem Gummischlauch in den Magen einführte und dann nach der Angabe von Sakaguchi und seinen Mitarbeitern (1924) halbstündlich drei Stunden lang den Blutzuckergehalt serienartig mit Bangscher Mikromethode untersuchte, dabei auch den Harn jede Stunde katheterisierte, die Zuckerprobe mit Benedictscher Methode ausführte und bei positivem Ausfall seine Reduktionskraft, wegen der geringen Menge des Harns, mit Bangscher Mikromethode bestimmte. Diese Fütterung von Zuckerlösung wurde verschiedene Male und in verschiedener Menge wiederholt, bis Spuren von Zucker im Harn auftraten, um dadurch die Zuckerausscheidungsschwelle genau zu bestimmen. Die Versuche, bei welchen die Glykosurie zu stark oder ganz negativ ausfiel, sodass sie zur Bestimmung des Schwellenwertes nicht gebraucht werden konnten, habe ich in allen meinen Tabellen nicht mitangegeben.

I. Einfluss der Funktion der Nebenniere auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

Dass durch Adrenalin, das Hormon des Nebennierenmarkes, die Zuckerausscheidungsschwelle fast immer deutlich ansteigt, ist schon von Nakayama (1924) und Lichtwitz (1926) mitgeteilt. Auch Pollak (1923) fand an Kaninchen bei Injektion von Adrenalin in grösseren Dosen die Hyperglykämie, ohne dass dabei eine Zuckerausscheidung im Urin festgestellt wurde. Er wollte aber diese Erscheinung nicht auf die Erhöhung der Zuckerausscheidungsschwelle zurückführen.

Diesen Versuchen nach kann man mit Sicherheit sagen, dass die Hyperfunktion des Nebennierenmarkes auf die Zuckerausscheidungsschwelle einen grossen Einfluss ausübt. Über die anderen Funktionsänderungen der Nebennieren weiss man nichts genaues anzugeben.

Es hat mich daher stark interessiert, festzustellen, welchen Einfluss die Funktionsstörungen der Nebenniere, sei es die Hyperfunktion, sei es die Hypofunktion, auf die Zuckerausscheidungsschwelle ausüben.

Bekanntlich besteht die Nebenniere aus zwei sowohl anatomisch-histologisch und entwicklungsgeschichtlich als auch funktionell ganz verschiedenen Bestandteilen, sodass der Gedanke nahe liegt, dass der Einfluss des einen Teils auf den Schwellenwert ganz anders ist als der des anderen.

In vorliegender Untersuchung ging ich also derart vor, dass ich den Einfluss der Nebennierenrinde auf den Schwellenwert einerseits, den des Nebennierenmarks auf denselben anderseits in den Zuständen der Hyper-resp. Hypofunktion beider Organanteile untersuchte. Die Hyperfunktion der Rinde wurde durch die Transplantation desselben Organanteiles, die Hypofunktion durch die Zerstörung mit dem Paquelin hervorgerufen.

Bei dem Markanteil wurde die Hyperfunktion durch die Adrenalininjektion, die Hypofunktion auch durch die Zerstörung mit Paquelin erzielt.

1. Einfluss der Transplantation der Nebennierenrinde auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

Hier wurde an Kaninchen zuerst ihre Zuckerausscheidungsschwelle durch die obengenannte Methode bestimmt. Dann wurde die Nebennierenrindensubstanz, die 3–5 Kaninchen entnommen wurde, dem Versuchstiere in die Bauchwand intramuskulär transplantiert. Nach dieser Operation wurde die Zuckerausscheidungsschwelle in gleicher Weise wiederholt bestimmt.

Das Transplantat wurde nach dem Versuch wieder herausgenommen und histologisch untersucht. Ausserdem wurde die Zuckerassimilationskraft vor und nach der Operation aus der

Stärke der Hyperglykämie unter Berücksichtigung der dargereichten Zuckermengen ermittelt.

Einzelne Daten sind in den Tabellen angegeben.

Tabelle I.

Versuch I. Kaninchen Nr. 1, 2350 g.

Datum	Zuckermenge g	Blutzucker mg% (Harnzucker %)						Schwellenwert %
		Vor	½ Std.	1	1½	2	3	
5. XI	3.6	95 (–)	158	183 (Spur)	171	146 (–)	112 (–)	0.18
7. „	3.3	98 (–)	156	175 (Spur)	162	168 (–)	120 (–)	0.17
9. „	3.3	97 (–)	165	173 (–)	169	175 (Spur)	132 (–)	0.17
10. XI	Transplantation (2.16 g.)							
11. XI	3.3	75 (–)	95	111 (Spur)	70	74 (0.36)	71 (Spur)	unter 0.11
12. „	3.3	91 (–)	112	135 (0.52)	121	92 (Spur)	81 (–)	unter 0.13
14. „	3.3	97 (–)	145	134 (Spur)	93	81 (Spur)	78 (–)	0.14
16. „	3.3	95 (–)	142	148 (Spur)	120	84 (Spur)	80 (–)	0.14

Wie die Tabelle zeigt, war der Schwellenwert der Kontrollversuche etwa 0,17–0,18%. Er wurde kurz nach der Transplantationsoperation auf etwa 0,10% erniedrigt, während er später bis auf 0,14% anstieg.

Die histologische Untersuchung des Transplantates, welches nach dem Tod des Tieres am 18. November herausgenommen wurde, zeigte, dass es teilweise in Gegeneration übergegangen war. Da die Zuckerdarreichungen in diesem Versuch immer gleich gross waren, kann man aus der Tabelle leicht ersehen, dass die Zuckerassimilationskraft zu der Erniedrigung der Zuckerausscheidungsschwelle umgekehrt proportional deutlich gesteigert war, sodass die alimentäre Hyperglykämie nach der Operation bei gleich grosser Zuckerdarreichung nur in geringerem Grade, und die darauf folgende Hypoglykämie deutlicher in die Erscheinung trat als vor der Operation. Diese Erscheinung wurde bei allen folgenden Versuchen beobachtet.

Tabelle II.

Versuch II. Kaninchen Nr. 2. 2760 g.

Datum	Zuckermenge g	Blutzucker mg % (Harnzucker %)						Schwellenwert %
		Vor	½ Std.	1	1½	2	3	
2. XI.	3.2	105 (−)	203	208 (Spur)	190	111 (−)	108 (−)	0.20
4. „	3.2	102 (−)	197	205 (Spur)	193	127 (Spur)	110 (−)	0.20
13. XI.	Transplantation (1.2 g)							
14. XI.	3.2	99 (−)	129	115 (−)	105	109 (−)	97 (−)	über 0.13
15. „	3.9	102 (−)	148	155 (Spur)	155	144 (Spur)	124 (0.39)	0.14
18. „	5.5	98 (−)	85	108 (−)	117	140 (−)	122 (Spur)	0.14
19. XI.	Entfernung des Transplantates							
22. XI.	5.1	96 (−)	174	171 (Spur)	157	154 (Spur)	135 (−)	0.17
26. „	3.9	102 (−)	180	198 (Spur)	166	112 (Spur)	108 (−)	0.19

Bei diesem Versuch war die Zuckerausscheidungsschwelle vor der Operation 0,20%. Nachdem die Nebennierenrinde transplantiert wurde, zeigte der Schwellenwert eine deutliche Erniedrigung (etwa 0,14%), der aber nach der Entfernung des Transplantates allmählich wieder zu dem früheren Wert zurückkehrte, was als sehr interessante Erscheinung bezeichnet werden muss. Das herausgenommene Transplantat zeigte leichte degenerative Veränderung. Auch bei diesem Versuch ging die Steigerung der Zuckerassimilationskraft mit der Erniedrigung des Schwellenwertes fast parallel.

Ganz ähnliche Ergebnisse hatten die Versuche an drei weiteren Kaninchen (Tabelle III).

TABELLE III.

Versuch III. Kaninchen Nr. 3, 2530 g.			Versuch IV. Kaninchen Nr. 4, 2650 g.			Versuch V. Kaninchen Nr. 5, 2380 g.		
Datum	Zuckermenge g	Schwellenwert. %	Datum	Zuckermenge g	Schwellenwert %	Datum	Zuckermenge g	Schwellenwert %
1. XI.	3.6	0.18	2. XI.	4.5	0.19	5. XI.	3.6	0.19
4. „	3.8	0.19	8. „	4.5	0.21	7. „	3.6	0.18
5. „ Transplantation (1.15 g)			15. „ Transplantation (2.20 g)			10. „ Transplantation (2.26 g)		
6. „	3.9	über 0.12	17. „	4.8	unter 0.13	11. „	3.6	unter 0.11
7. „	4.5	0.14	18. „	4.8	0.13	12. „	3.6	unter 0.12
8. „	5.4	unter 0.15	19. „	4.8	0.14	14. „	3.6	unter 0.13
9. „	4.8	0.15	21. „	4.8	unter 0.16			
13. „	4.2	0.16						
Das Tier starb am 16. Nov. Ein Teil des Transplantates verwandelte sich in eine käsige Masse.						Am 16. Nov. starb das Tier. Eine leichte regressive Veränderung an an dem Transplantat nachgewiesen		

In der folgenden Tabelle stelle ich meine Versuchsresultate zusammen:

Tabelle IV.

Nr.	Transplantat g	Schwellenwert %		
		Kontrolle	nach der Transplantation	maximale Erniedrigung
I.	2.16	0.17–0.18	unter 0.11–0.14	über 0.06
II.	1.20	0.20	0.14–0.18	0.06
III.	1.15	0.18–0.19	0.14–0.16	0.04
IV.	2.20	0.19–0.21	unter 0.13–0.16	über 0.06
V.	2.36	0.18–0.19	unter 0.11–0.13	über 0.07

Die Tabelle zeigt, dass die Transplantation der Nebennierenrindensubstanz auf die Zuckerausscheidungsschwelle bei allen Versuchen immer bedeutend herabsetzend einwirkte, und dass dieser Einfluss kurz nach der Operation auffallender ist als in der späteren Zeit.

Weil das Transplantat, wie histologisch nachgewiesen wurde, mit der Zeit eine regressive Veränderung zeigt, so liegt der Gedanke nahe, dass das allmähliche Steigen des einmal deutlich erniedrigten Schwellenwertes auf die Verminderung der funktionierenden Nebennierenrindensubstanz zurückzuführen sei. Diese Vermutung wird auch durch den Befund bekräftigt, dass im Versuche II die starke Erniedrigung des Schwellenwertes nach der Transplantation der Nebennierenrinde in das Tier nach der Entfernung des Transplantates bis auf den normalen Wert nachliess.

Hier sei auch erwähnt, dass die Herabsetzung der Zuckerausscheidungsschwelle in diesen Untersuchungen immer mit der Steigerung der Zuckerassimilation Hand in Hand ging.

2. Einfluss der Zerstörung der Nebennierenrinde auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

Nachdem ich in den oben beschriebenen Versuchen festgestellt hatte, dass die Transplantation der Nebennierenrinde stets die Herabsetzung des Schwellenwertes für Zuckerausscheidung verursachte, wollte ich weiter beobachten, welchen Einfluss die Hypo-

funktion der Nebennierenrinde auf die Zuckerausscheidungsschwelle ausüben würde.

Dazu wurde an Kaninchen nach der Bestimmung ihrer Zuckerausscheidungsschwelle die Nebennierenrinde mit Paquelin vorsichtig zerstört, ohne dass dabei irgend eine Nebenverletzung der Eingeweide, besonders des Splanchnicus hervorgerufen wurde, indem diese durch mit physiologischer NaCl-Lösung befeuchtete Gaze vollständig geschützt wurden. Bei dieser Operation wurde auch nicht versäumt, die Nebennebennieren im Bauch und im Hodensack ausfindig zu machen und, wenn sie gefunden wurden, sofort zu entfernen. Nach dieser Operation wurde die Zuckerausscheidungsschwelle in gleicher Weise wiederholt bestimmt.

Nach dem Schluss der Versuche wurde die kauterisierte Nebenniere histologisch untersucht, und es wurde festgestellt, dass ihre Rindensubstanz zum grösseren Teil zerstört worden war.

Die einzelnen Daten sind in den folgenden Tabellen angegeben.

Tabelle V.

Versuch I. Kaninchen Nr. 6, 2750 g.

Datum	Zuckermenge g	Blutzuckergehalt mg % (Harnzucker %)						Schwellenwert %
		Vor	½ Std.	1	1½	2	3	
16. XI.	9.6	105 (–)	158	192 (–)	207	194 (Spur)	130 (Spur)	0.20
20. „	8.1	102 (–)	201	208 (Spur)	195	121 (Spur)	108 (–)	0.20
22. XI.	Nebennierenrindenkauterisation							
24. XI.	4.5	100 (–)	105	120 (–)	180	228 (–)	200 (–)	über 0.23
25. „	6.0	96 (–)	133	181 (–)	191	228 (–)	232 (–)	über 0.23
26. „	6.6	98 (–)	115	145 (–)	198	226 (–)	219 (–)	über 0.23

Wie die Tabelle zeigt, war die Zuckerausscheidungsschwelle im normalen Zustand 0,20%. Aber sie stieg nach der Operation deutlich an (auf über 0,23%). Die Zuckerassimilationskraft wurde nach der Operation mit der Steigerung des Schwellenwertes auffallend herabgesetzt.

Das Tier kam nach der Operation etwas herunter und ging am 26. Nov. unter allgemeiner Schwäche zugrunde.

Tabelle VI.

Versuch II. Kaninchen Nr. 7, 2110 g.

Datum	Zuckermenge g	Blutzuckergehalt mg % (Harnzucker %)						Schwellenwert %
		Vor	½ Std.	1	1½	2	3	
15. XI.	5.4	100 (–)	186	191 (–)	157	135 (–)	114 (–)	über 0.19
17. „	5.7	111 (–)	185	211 (–)	163	118 (Spur)	109 (Spur)	0.21
19. „	5.4	105 (–)	177	193 (–)	162	114 (–)	110 (–)	über 0.19
22. XI.	Nebennierenrindenkauterisation							
24. XI.	5.4	121 (–)	170	197 (–)	197	193 (–)	152 (–)	über 0.20
25. „	6.0	106 (–)	164	187 (–)	191	192 (Spur)	118 (–)	0.19
27. „	6.0	111 (–)	187	205 (Spur)	195	190 (Spur)	154 (–)	0.20
30. „	6.6	118 (–)	182	212 (Spur)	190	185 (Spur)	117 (–)	0.21

Bei diesem Versuch hat die Operation, wie man aus der Tabelle ersieht, keinen sichtbaren Einfluss weder auf die Zuckerausscheidungsschwelle noch auf die Zuckerassimilation ausgeübt.

Die Versuche III bis VI wurden genau wie die zwei vorangehenden ausgeführt (Tabelle VII).

In der Tabelle VIII sind meine Untersuchungsresultate übersichtlich zusammengestellt:

Tabelle VIII.

Nr.	Zuckerausscheidungsschwelle %		
	Kontrolle	nach der Operation	maximale Erhöhung
I.	0.20	über 0.23	über 0.03
II.	0.19–0.21	0.19–0.21	0
III.	0.17–0.19	0.18–0.19	0
IV.	0.17–0.18	0.20–0.21	0.03
V.	0.17	über 0.20	über 0.03
VI.	0.19	0.21–0.23	0.04

Tabelle VII.

Versuch III.			Versuch IV.			Versuch V.			Versuch VI.		
Kaninchen Nr. 8, 2330 g.			Kaninchen Nr. 9, 2450 g.			Kaninchen Nr. 10, 2650 g.			Kaninchen Nr. 11, 2490 g.		
Datum	Zuckermenge (g)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckermenge (g)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckermenge (g)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckermenge (g)	Schwellenwert (%)
21. XI.	4.5	über 0.17	20. XI.	5.4	0.17	28. XI.	4.5	0.17	28. XI.	5.4	0.19
23. „	5.1	0.19	23. XI.	6.3	0.18	1. XII.	5.4	0.17	2. XII.	6.0	0.19
27. „	Nebennierenrindenkauterisation		27. „	Nebennierenrindenkauterisation		4. „	Nebennierenrindenkauterisation		4. „	Nebennierenrindenkauterisation	
29. „	5.1	0.17	29. „	4.8	über 0.18	6. „	4.5	0.20	6. „	5.7	über 0.18
30. „	5.4	0.18	1. XII.	5.4	0.20	7. „	6.0	über 0.20	8. „	6.4	unter 0.23
2. XII.	5.4	0.19	3. „	5.8	0.21	8. „	6.3	über 0.20	11. „	7.8	0.22
7. „	5.1	0.18	8. „	6.9	0.21				14. „	7.5	0.21
									21. „	7.8	0.23
Zuckerassimilationskraft nach der Operation nicht merklich verändert.			Der Schwellenanstieg ging mit der Verschlechterung der Zuckerassimilationskraft Hand in Hand.			Wegen der Ungleichheit der Zuckergabe vor und nach der Operation war der Zusammenhang zwischen der Schwelle und der Zuckerassimilationskraft nicht einleuchtend. Am 9. Dez. ging das Tier an Allgemeinschwäche zugrunde.					

Aus der Tabelle VIII ersieht man, dass die Zerstörung der Nebennierenrinde in den meisten Fällen eine Steigerung des Schwellenwertes verursachte. Weil ein operativer Eingriff im allgemeinen eine mehr oder weniger deutliche Herabsetzung der Zuckerassimilationsfähigkeit nach sich zieht, und eine solche Störung nach der Angabe der Schule von Inada und Sakaguchi als Regel von dem Schwellenwertanstieg begleitet wird, so nahm ich auch auf dieses Moment eine gewisse Rücksicht. Dass aber die Erhöhung des Schwellenwertes bei meinen Versuchen nicht nur kurz nach der Operation gefunden wurde, sondern auch zehn Tage danach (wie bei Versuch IV) in unvermindertem Grade fortbestand, macht es wahrscheinlich, dass die Zerstörung der Nebennierenrinde direkt einen steigernden Einfluss auf die Zuckerausscheidungschwelle ausübt. Wie der negative Ausfall oft vorkommen kann, lässt sich schwer beantworten. Ein Zurückbleiben von Nebennierenrinde darf man nicht dafür verantwortlich machen, weil ich bei solchen Fällen bei der Sektion mit aller Sorgfalt, aber vergeblich nach ihr gesucht habe.

3. Einfluss der Adrenalininjektion auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

Um den Einfluss der Hyperfunktion des Nebennierenmarkes auf die Zuckerausscheidungsschwelle zu studieren, benutzte ich sein Produkt, das Adrenalin.

Dass die Zuckerausscheidungsschwelle zu dem vegetativen Nervensystem in inniger Beziehung steht, und vor allem bei Sympathicotonie erhöht ist, wurde, wie oben gesagt, von vielen Seiten ausgesprochen. So sahen Nakayama (1924) und Shim (1925) beim Menschen und Kaninchen die Steigerung des Schwellenwertes gegen den normalen Wert durch die Darreichung von Adrenalin, während Hamman u. Hirschman (1917) diesen Befund vermissten. Um diese Frage klar zu stellen, unternahm ich die folgenden Versuche.

Bei diesen Untersuchungen ging ich so vor, dass ich an Kaninchen einmal den Schwellenwert bei alimentärer Glykocurie, ein anderes Mal den bei Adrenalinglykosurie bestimmte. Im letzteren

Fall wurde den Kaninchen eine solche Menge 1‰iges Adrenalin subcutan injiziert, dass die Glykosurie in Spuren hervortrat, und dabei der Blutzuckergehalt halbstündlich drei Stunden lang untersucht.

Die einzelnen Daten sind in den Tabellen angegeben.

Tabelle IX.

Versuch I. Kaninchen Nr. 12, 1960 g.

Datum	Zuckerzufuhr g.	Adrenalin ccm	Blutzucker mg % (Harnzucker %)						Schwellenwert %
			Vor	½ Std.	1	1½	2	3	
6. IV.	8.0		105 (–)	143	175 (–)	188	152 (–)	142 (–)	über 0.19
9. „	9.3		107 (–)	200	207 (Spur)	187	182 (0.45)	159 (–)	0.20
11. „	8.4		102 (–)	154	200 (–)	179	162 (Spur)	154 (–)	0.20
12. „	9.6		109 (–)	177	200 (Spur)	204	194 (Spur)	148 (–)	0.20
16. „		0.28	117 (–)	193	215 (–)	227	244 (–)	240 (Spur)	0.24
20. „		0.30	90 (–)	157	190 (–)	209	240 (–)	222 (–)	über 0.24
26. „		0.31	104 (–)	198	226 (–)	239	253 (–)	243 (Spur)	0.25

Aus der Tabelle ersieht man, dass der Schwellenwert bei der alimentären Glykosurie 0,20%, dagegen bei der Adrenalinglykosurie 0,24–0,25% betrug, dass er also durch die Adrenalininjektion auffallend erhöht wurde.

Bei weiteren vier Fällen wurde der Versuch in ganz ähnlicher Weise ausgeführt. (Tabelle X).

Meine Untersuchungsresultate sind übersichtlich in der Tabelle XI zusammengestellt.

Wie diese Tabelle zeigt, stimmen die Untersuchungsresultate meiner Versuche an 5 Kaninchen mit der Angabe von Nakayama (1924) ganz überein, nämlich dass der Schwellenwert bei der Adrenalinglykosurie in der Regel höher als bei der alimentären Glykosurie ist.

Tabelle X.

Versuch II.				Versuch III.				Versuch IV.				Versuch V.			
Kaninchen Nr. 13, 2170 g.				Kaninchen Nr. 14, 2520 g.				Kaninchen Nr. 15, 2660 g.				Kaninchen Nr. 16, 2330 g.			
Datum	Zuckerzufuhr (g)	1 ‰ Adrenalin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckerzufuhr (g)	1 ‰ Adrenalin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckerzufuhr (g)	1 ‰ Adrenalin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckerzufuhr (g)	1 ‰ Adrenalin (ccm)	Schwellenwert (%)
8. IV.	12.0		über 0.22	6. IV.	12.0		unter 0.23	8. IV.	14.4		0.20	20. IV.	8.0		0.18
10. „	11.4		unter 0.24 (etwa 0.23)	9. „	10.8		(etwa 0.22) 0.21	11. „	15.0		0.20	24. „	8.7		0.18
15. „		0.22	über 0.25	12. „		0.26	0.26	15. „		0.40	über 0.22	27. „	8.4		0.17
19. „		0.28	0.27	16. „		0.24	0.25	19. „		0.50	über 0.23	30. „		0.20	0.22
23. „		0.28	über 0.26	18. „		0.26	über 0.24	24. „		0.58	0.23	2. V.		0.20	über 0.21
								27. „		0.57	0.23	5. „		0.24	0.22

Tabelle XI.

Nr.	Zuckerausscheidungsschwelle %		
	bei Alimentärer Glykosurie	bei Adrenalin-glykosurie	Erhöhung durch Adrenalin
I.	0.20	0.24–0.25	0.04–0.05
II.	0.23	0.27	0.04
III.	0.21–0.22	0.25–0.26	0.03–0.05
IV.	0.20	0.23	0.03
V.	0.17–0.18	0.22	0.04–0.05

4. *Einfluss der Zerstörung des Nebennierenmarkes auf die Zuckerausscheidungsschwelle.*

Nachdem in dem vorangehenden Kapitel festgestellt wurde, dass das Inkret des Nebennierenmarkes, das Adrenalin, die Zuckerausscheidungsschwelle erhöht, wie früher auch von Nakayama (1924) ausgesprochen wurde, war es eine interessante Frage zu sehen, welchen Einfluss der Ausfall des Nebennierenmarkes auf die Zuckerausscheidungsschwelle ausübe, was bis jetzt meines Wissens noch gar nicht studiert wurde, so dass ich mich weiter mit dieser Frage beschäftigen wollte. Zu diesem Zwecke habe ich an Kaninchen zuerst ihren Schwellenwert bestimmt und dann das Nebennierenmark der eröffneten Nebennieren mit dem Paquelin kauterisiert, unter denselben Kautelen wie bei der Kauterisation der Nebennierenrinde.

Nach dieser Operation wurde dann die Zuckerausscheidungsschwelle im Verlauf der Zeit wiederholt in gleicher Weise bestimmt.

Die einzelnen Daten der Untersuchungen sind in den Tabellen angegeben.

Die Tabelle XII zeigt, dass der normale Schwellenwert dieses Tieres 0,18–0,20% betrug. Am nächsten Tage nach der Operation zeigte die Schwelle noch den normalen Wert; aber vom dritten Tage ab wurde er bedeutend erniedrigt (0,13%) gefunden, um dann allmählich wieder bis auf 0,17% am 9. Tag aufzusteigen.

In ähnlicher Weise wurde der Versuch an weiteren vier Kaninchen ausgeführt. (Tabelle XIII).

Tabelle XII.

Versuch I. Kaninchen Nr. 17. 2160 g.

Datum	Zucker-zufuhr g	Blutzuckergehalt mg % (Harnzucker %)						Schwellenwert %
		Vor	½ Std.	1	1½	2	3	
3. XII.	10.0	105 (−)	188	203 (Spur)	202	185 (Spur)	142 (−)	0.20
5. „	8.1	98 (−)	176	183 (−)	189	171 (Spur)	120 (−)	0.18
9. „	8.1	110 (−)	188	194 (−)	199	180 (Spur)	132 (−)	0.19
10. XII.	Nebennierenmarkkauterisation							
11. XII.	4.8	97 (−)	169	182 (−)	180	161 (Spur)	141 (−)	0.18
12. „	4.2	94 (−)	132	133 (Spur)	130	122 (Spur)	102 (−)	0.13
13. „	4.8	93 (−)	131	136 (Spur)	135	126 (Spur)	91 (−)	0.13
15. „	4.8	95 (−)	150	158 (−)	152	147 (Spur)	113 (−)	0.15
18. „	5.4	98 (−)	170	170 (−)	166	162 (Spur)	148 (−)	0.17

Meine Untersuchungsresultate stelle ich nun in der folgenden Tabelle XIV zusammen:

Tabelle XIV.

Nr.	Zuckerausscheidungsschwelle %		
	Kontrolle	der niedrigste Wert nach der Operation	Erniedrigung durch Operation
I.	0.18–0.20	0.13	0.05–0.07
II.	0.17–0.18	0.15	0.02–0.03
III.	0.19	0.18	0.01
IV.	0.17–0.19	0.14	0.03–0.05
V.	0.21	0.14	0.07

Wie man aus dieser Tabelle ersieht, wurde der Schwellenwert nach der Nebennierenmarkkauterisation in den meisten Fällen mehr oder minder deutlich niedriger gefunden als vor der Operation. Nur bei einem Falle (Versuch III) war der Schwellenwert nach wie vor fast unverändert.

TABELLE XIII.

Versuch II.			Versuch III.			Versuch IV.			Versuch V.		
Kaninchen Nr. 18. 2350 g.			Kaninchen Nr. 19. 2470 g.			Kaninchen Nr. 20. 2100 g.			Kaninchen Nr. 21. 2270 g.		
Datum	Zuckerzufuhr (g)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckerzufuhr (g)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckerzufuhr (g)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckerzufuhr (g)	Schwellenwert (%)
13. XII.	8.5	0.18	16. XII.	6.9	0.19	9. XII.	5.4	0.18	19. XII.	6.0	0.21
16. „	8.5	0.17	18. „	6.9	0.19	12. „	5.7	0.17	23. „	6.3	0.21
21. „	8.5	0.17	22. „	Nebennierenmark-kauterisation		14. „	5.7	0.19	28. „	6.3	über 0.20
4. I.	Nebennierenmark-kauterisation		24. „	6.0	0.18	22. „	Nebennierenmark-kauterisation		4. I.	Nebennierenmark-kauterisation	
6. „	7.2	0.15	25. „	6.4	0.19	24. „	4.8	0.14	5. „	5.7	0.20
7. „	6.6	0.16	27. „	6.9	unter 0.20	25. „	5.1	0.15	6. „	4.8	0.14
9. „	6.6	0.17	30. „	6.3	0.18	27. „	5.4	0.17	7. „	4.8	0.14
13. „	7.2	0.18				30. „	5.4	0.16	9. „	5.1	0.15
									12. „	5.4	0.17

Bei Versuch II und IV wurde er kurz nach der Operation zwar deutlich erniedrigt; doch kehrte er dann allmählich wieder fast bis auf den ursprünglichen Wert zurück.

Diese Erniedrigung des Schwellenwertes möchte ich nicht auf den direkten operativen Eingriff, sondern auf den Ausfall des Nebennierenmarkes zurückführen, weil er bei den Versuchen I und V, bei welchen der Schwellenwert erst vom dritten Tag nach der Operation an sehr bedeutend herunterkam, am ersten Tag, an welchem der Einfluss des operativen Eingriffs am stärksten sein müsste, einen fast normalen Wert zeigte. Diese Ansicht kann leicht angenommen werden, wenn man bedenkt, dass der Schwellenwert, wie in der vorangehenden Arbeit schon beschrieben wurde, durch die Adrenalininjektion ansteigt, die der Hyperfunktion des Nebennierenmarkes entspricht.

Hier sei auch erwähnt, dass die Versuchsergebnisse mit dem Standpunkt der Autoren (Goldzieher, 1928; Shiozawa, 1926; Oda, 1928; Tokumitsu, 1918; Bertram u. Bornstein, 1923, etc.), die ein antagonistisches Verhalten zwischen Rinden- und Marksubstanz annehmen, sehr gut übereinstimmen, da man in den vorangehenden Versuchen die den Schwellenwert erniedrigende Einwirkung der Transplantation der Rindensubstanz feststellen konnte.

Was die Assimilationskraft für Zucker anbetrifft, so ist wegen der Ungleichheit der Grösse der Zuckerzufuhr bei den verschiedenen Versuchen nicht leicht zu erkennen, wie sie durch die Operation beeinflusst wurde.

Zusammenfassung.

1. Der Schwellenwert für alimentäre Glykosurie bei Kaninchen betrug im normalen Zustand meist 0,17–0,20%.

2. Bei der Transplantation der Nebennierenrindensubstanz fand ich bei allen Versuchen eine Herabsetzung des Schwellenwertes und eine Steigerung der Zuckerassimilationskraft.

3. Bei der Zerstörung der Nebennierenrindensubstanz stieg der Schwellenwert in den meisten Fällen, manchmal blieb er aber unverändert. Seine Steigerung war immer positiv und auffallender bei den Tieren, welche die Operation nicht lange überlebten.

Die Zuckerassimilationskraft zeigte in diesen Versuchen keine eindeutige Veränderung.

4. Der Schwellenwert bei der Adrenalinglykosurie wurde in der Regel höher gefunden als bei der alimentären.

5. Bei der Zerstörung des Nebennierenmarkes fand in den meisten Fällen eine Herabsetzung des Schwellenwertes statt, die aber später an Stärke allmählich nachliess.

Das Verhalten der Assimilationskraft für Zucker konnte hierbei nicht eindeutig beurteilt werden.

II. Einfluss der Funktion der Schilddrüre auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

Bis jetzt wurde der Zusammenhang zwischen der Funktion der Schilddrüse und der Zuckerausscheidungsschwelle nur wenig studiert. Vor kurzer Zeit hat Kawashima (1927) bei Menschen durch perorale Darreichung von Schilddrüsenpräparat die Erhöhung des Schwellenwertes und Verschlechterung der Assimilationskraft für Zucker beobachtet. Dagegen hat jedoch Bailey (1919) bei seinen klinischen Beobachtungen gefunden, dass der Schwellenwert bei Hypothyreose höher und bei Hyperthyreose niedriger war.

Bekanntlich beeinflusst das Hormon der Schilddrüse direkt oder indirekt vermittels des chromaffinen Systems das vegative Nervensystem (besonders den Sympathicus), dessen Umstimmung, wie schon beschrieben, eine Veränderung des Schwellenwertes verursacht, und auch den Gesamtstoffwechsel, der dadurch besonders gesteigert wird, beeinflusst.

Bei solcher Sachlage liegt der Gedanke nahe, dass die Funktionsänderung der Schilddrüse irgend eine Veränderung des Schwellenwertes nach sich ziehe. Um diese Verhältnisse aus Licht zu bringen, habe ich die folgenden Untersuchungen vorgenommen.

Bei diesen Versuchen ging ich so vor, dass ich zuerst den Einfluss der Hyperfunktion der Schilddrüse auf den Schwellenwert untersuchte, indem einmal das Schilddrüsenpräparat peroral, ein andermal subcutan verabreicht wurde. Dann wurde der Einfluss

ihrer Afunktion untersucht, indem die Schilddrüse durch Operation entfernt wurde.

1. *Einfluss der Fütterung mit Schilddrüsenpräparat auf die Zuckerausscheidungsschwelle.*

Hier wurde zuerst der Schwellenwert an Kaninchen bestimmt. Dann wurde 0,15 g Thyreoideum siccum (Parke, Davis & Co.) täglich per os gegeben, bis Diarrhoe, Haarausfall und Körpergewichtsabnahme als Intoxikationssymptome auftraten, und dann den Schwellenwert wieder bestimmt. Danach wurde dass Mittel ausgesetzt, und nachdem das Tier sich von den Intoxikationssymptomen erholt hatte, wurde die Zuckerausscheidungsschwelle noch einmal bestimmt, um damit zu bestätigen, dass ihre Veränderung auf dieser Intoxikation beruhte.

Die einzelnen Daten der Untersuchungen sind in den folgenden Tabellen angegeben.

Tabelle XV.

Versuch I. Kaninchen Nr. 22.

Datum	Periode	Körpergewicht g	Zuckermenge g	Blutzucker mg % (Harnzucker %) Vor	½ Std.	1	1½	2	3	Schwellenwert %
1. V.	ohne Thyreoid. siccum	2550	9.6	102 (–)	195	206 (Spur)	190	170 (Spur)	144 (–)	0.20
6. „		2630	11.4	98 (–)	201	212 (0.45)	194	165 (Spur)	132 (–)	unter 0.21
9. „		2650	9.3	109 (–)	189	204 (Spur)	200	178 (Spur)	128 (–)	0.20
25. „	mit Thyreoid. siccum	2400	5.5	115 (–)	207	224 (–)	211	192 (–)	165 (–)	über 0.22
27. „		2370	6.6	107 (–)	223	245 (Spur)	221	198 (–)	177 (–)	0.24
30. „		2350	4.5	115 (–)	248	254 (Spur)	233	155 (–)	145 (–)	0.25
11. VI.	ohne Thyreoid. siccum	2710	10.0	103 (–)	178	215 (Spur)	201	154 (Spur)	117 (–)	0.21
15. „		2700	9.6	101 (–)	198	205 (Spur)	183	135 (–)	106 (–)	0.20

Wie man aus der Tabelle ersieht, betrug der Schwellenwert vor der Thyreoideumperiode 0,20%. Vom 10. bis 30. Mai wurde das Mittel täglich in der Dosis von 0,15 g peroral gegeben. Als

Intoxikationserscheinungen beobachtete man Körpergewichtsabnahme, Haarausfall und Diarrhoe. In dieser Periode wurde der Schwellenwert auffallend erhöht, und dementsprechend wurde die Zuckerassimilationskraft stark vermindert. Nachdem aber das Mittel ausgesetzt wurde, kamen sowohl die Zuckerausscheidungsschwelle als auch die Zuckerassimilationskraft zum normalen Werte zurück.

Tabelle XVI.

Versuch II. Kaninchen Nr. 23.

Datum	Periode	Körpergewicht g	Zuckermenge g	Blutzucker mg % (Harnzucker %) Vor.	½ Std.	1	1½	2	3	Schwellenwert %
1. V.	ohne Thyreoid. siccum	2370	7.2	94 (–)	159	174 (Spur)	134	118 (–)	109 (–)	0.17
5. „		2380	7.5	97 (–)	170	178 (Spur)	145	123 (–)	110 (–)	0.17
16. V.	mit Thyreoid. siccum	2080	7.2	98 (–)	185	197 (–)	205	182 (Spur)	137 (–)	0.20
18. „		2060	7.5	103 (–)	195	203 (–)	184	132 (–)	115 (–)	über 0.20
21. „		2040	7.5	109 (–)	188	205 (–)	191	153 (–)	121 (–)	über 0.20
3. VI.	ohne Thyreoid. siccum	2440	7.2	100 (–)	172	188 (Spur)	154	121 (–)	104 (–)	0.18
6. „		2470	7.2	93 (–)	157	177 (–)	162	123 (Spur)	115 (–)	0.17

Thyreoideum siccum wurde vom 6. bis 21. Mai fortgesetzt täglich in der Dosis von 0,15 g verabreicht. Die Diarrhoe und der Haarausfall traten seit 14. Mai auf; die Körpergewichtsabnahme wurde auch deutlich beobachtet.

Der Schwellenwert betrug in den Thyreoideumfreien Perioden 0,17–0,18% und in der Thyreoideumperiode über 0,20%, wurde also durch das Mittel deutlich erhöht. Weil die Zuckerzufuhr fast immer in gleichen Mengen erfolgte, ging die Herabsetzung der Zuckerassimilationskraft annähernd parallel mit der Steigerung der Zuckerausscheidungsschwelle.

Weitere drei Tiere wurden in ganz ähnlicher Weise untersucht. (Tabelle XVII).

Meine Untersuchungsresultate stellte ich übersichtlich in der

Tabelle XVII.

Versuch III.					Versuch IV.					Versuch V.				
Kaninchen Nr. 24					Kaninchen Nr. 25					Kaninchen Nr. 26				
Datum	Periode	Körpergewicht (g)	Zuckermenge (g)	Schwellenwert %	Datum	Periode	Körpergewicht (g)	Zuckermenge (g)	Schwellenwert %	Datum	Period	Körpergewicht (g)	Zuckermenge (g)	Schwellenwert %
6. V.	ohne Thyreoid. siccum	2500	6.6	0.18	8. V.	ohne Thyreoid. siccum	2280	8.4	über 0.22	9. V.	ohne Thyreoid. siccum	2740	6.0	0.19
10. „		2530	6.6	0.18	11. „		2300	9.0	unter 0.24	18. „		2700	6.3	unter 0.20
25. „	mit Thyreoid. siccum	2180	4.8	über 0.20	16. „		2300	9.3	0.23	29. „	mit Thyreoid. siccum	2430	6.0	0.23
27. „		2120	5.1	0.21	29. „	mit Thyreoid. siccum	1870	8.0	0.23	31. „		2360	5.4	über 0.22
30. „		2080	5.1	über 0.20	31. „		1800	8.7	0.23	3. VI.		2270	5.1	0.24
6. VI.	ohne Thyreoid. siccum	2460	6.3	unter 0.19	11. VI.	ohne Thyreoid. siccum	2210	10.0	0.22	18. „	ohne Thyreoid. siccum	2650	5.7	0.20
					15. „		2230	9.6	0.23	22. „		2680	5.9	0.19
Thyreoid. siccum in der Dosis von 0.15 g pro die vom 11. bis 30. Mai fortgesetzt dargereicht					Thyreoid. siccum vom 16. bis 31. Mai in derselben Dosis verabreicht.					Thyreoid. siccum vom 19. Mai bis 3. Juni fortgesetzt dargereicht.				

Tabelle XVIII zusammen.

Tabelle XVIII.

Nr.	Zuckerausscheidungsschwelle %			
	Vor d. Thyreoide-umperiode	Thyreoideum-periode	nach d. Thyreoi-deumperoide	Steigerung
I.	0.20	0.24–0.25	0.20–0.21	0.05
II.	0.17	über 0.20	0.17–0.18	über 0.03
III.	0.18	0.21	unter 0.19	0.03
IV.	0.23	0.23	0.22–0.23	0
V.	0.19	0.23–0.24	0.19–0.20	0.05

Aus der Tabelle kann man ersehen, dass der Schwellenwert in den meisten Fällen durch die Thyreoideumzufuhr gesteigert wurde, wobei der Schwellenwertanstieg die Neigung zeigte, im Laufe der Thyreoideumperiode oft an Grad etwas zuzunehmen.

Die Assimilationskraft für Zucker setzte sich in den meisten Fällen beim Anstieg des Schwellenwertes in der Thyreoideumperiode mehr oder minder deutlich herab.

Diese Resultate an den Kaninchen stimmen mit der Angabe von Kawashima(1927), im Gegensatz zu der von Bailey(1919), ganz gut überein.

2. *Einfluss der einmaligen Injektion von Schilddrüsenpräparat auf die Zuckerausscheidungsschwelle.*

Nachdem ich in der vorangehenden Untersuchung festgestellt hatte, dass der Schwellenwert durch fortgesetzte perorale Darreichung von Schilddrüsenpräparat erhöht wird, wollte ich weiter die direkte Wirkung des Schilddrüsenhormons auf den Schwellenwert untersuchen.

Zu diesem Zwecke benutzte ich als Schilddrüsenhormon Thyroxin (Roche).

Bei diesen Versuchen wurden 4 ccm von 1‰igem Thyroxin Kaninchen, deren Schwellenwert vorher bestimmt war, 30–50 Min. vor der Zuckerfütterung subcutan injiziert und die Zuckerausscheidungsschwelle bestimmt.

Tabelle XIX.

Versuch I. Kaninchen Nr. 27. 2550 g.

Datum	Zuckerzufuhr g	1 % Thyroxin ccm	Blutzucker mg % (Harnzucker %)						Schwellenwert %
			Vor	½ Std.	1	1½	2	3	
20, VI	9.6		102 (–)	168	190 (–)	205	189 (Spur)	147 (–)	0.20
24, „	10.0		98 (–)	193	214 (Spur)	203	175 (0.48)	122 (–)	unter 0.21
28, „	10.0	4.0	110 (–)	189	202 (–)	223	216 (–)	215 (–)	über 0.22
3, VII	10.0		105 (–)	203	208 (Spur)	190	110 (–)	108 (–)	0.20
5, „	10.0	4.0	104 (–)	201	225 (–)	247	236 (Spur)	229 (Spur)	0.24

Wie die Tabelle XIX zeigt, betrug der normale Schwellenwert 0,20%, während er durch die Thyroxininjektion auf 0,24% anstieg.

Weil in diesem Versuchen immer fast gleich grosse Mengen von Zucker dargereicht wurden, ging die Verminderung der Assimilationskraft für Zucker, wie man aus der Tabelle leicht ersehen kann, ganz parallel mit der Steigerung der Zuckerausscheidungsschwelle.

Hier sei noch erwähnt, dass bei Thyroxinuntersuchungen die glykämische Kurve nicht nur höher, sondern auch bedeuten verlängert ablief. Diese Erscheinung wurde auch bei den meisten folgenden Versuchen beobachtet. (Tabelle XX).

Zur Übersicht stelle ich meine Untersuchungsresultate in der folgenden Tabelle XXI zusammen.

Tabelle XXI.

Nr.	Zuckerausscheidungsschwelle %		
	Kontrollversuch	Tyroxinversuch	Erhöhung durch Thyroxin
I	0.20	0.24	0.04
II	0.21 – 0.22	0.27	0.05—0.06
III	0.18—0.19	0.24	0.05—0.06
IV	0.16—0.17	0.19	0.02—0.03
V	0.18 – 0.19	0.23—0.24	0.04—0.06

TABELLE XX.

Versuch II.				Versuch III.				Versuch IV.				Versuch V.			
Kaninchen Nr. 28, 2420 g.				Kaninchen Nr. 29, 2160 g.				Kaninchen Nr. 30, 2330 g.				Kaninchen Nr. 31, 2250 g.			
Datum	Zuckermenge (g)	1 ‰ Thyroxin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckermenge (g)	1 ‰ Thyroxin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckermenge (g)	1 ‰ Thyroxin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckermenge (g)	1 ‰ Thyroxin (ccm)	Schwellenwert (%)
25. VI.	8.4		0.21	20. VI.	8.1		0.18	27. VI.	6.3		0.16	6. VII.	6.0		0.19
29. „	8.1		0.22	25. „	8.1		unter 0.20	8. VII.	6.3		unter 0.18	13. „	6.0		0.18
6. VII.	9.0	4.0	über 0.25	29. „	8.1		0.18	10. „	7.2	4.0	0.19	20. „	6.0	4.0	0.23
10. „	7.2		0.21	1. VII.	10.2	4.0	0.24	15. „	6.9		0.17	24. „	6.3		0.19
13. „	9.9	4.0	0.27	5. „	8.1		0.19	20. „	8.1	4.0	0.19	27. „	6.0	4.0	0.24
				9. „	11.0	4.0	über 0.23								

Der Schwellenwert wurde, wie die Tabelle XXI zeigt, bei allen Versuchen durch die einmalige Thyroxininjektion deutlich erhöht, sodass man wohl diese Erscheinung weder auf die Nachwirkung noch auf die Umstimmung des Körpers, sondern wohl nur auf die direkte Wirkung des Schilddrüsenhormons zurückführen darf.

Die Störung der Assimilationskraft für Zucker ging auch hier häufig parallel mit der Steigerung des Schwellenwertes.

3. Einfluss der Thyreoidektomie auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

In den vorangehenden Versuchen hatte ich festgestellt, dass der Überschuss des Schilddrüsenhormons im Organismus die Erhöhung des Schwellenwertes und Herabsetzung der Assimilationskraft verursacht.

Nun ist es eine hergebrachte Ansicht, dass der allgemeine Stoffwechsel beim Fehlen der Schilddrüsenfunktion eine Veränderung gegen die Norm erleidet, insofern als er in seiner Stärke herabgesetzt wird. Dies äussert sich beim Kohlehydratstoffwechsel darin, dass die Assimilationsgrenze für Kohlenhydrat gegen die Norm erhöht ist (Knöpfelmacher, 1904; Eppinger, Falta & Rudinger, 1908; Frontali, 1913). Wie aber dabei die Zuckerausscheidungsschwelle beeinflusst wird, ist noch nicht ganz aufgeklärt.

Wenn man daran denkt, dass die Veränderung der Zuckerassimilationskraft in meinen vorhergehenden Versuchen fast immer eine Änderung der Zuckerausscheidungsschwelle nach sich zeigt, darf man wohl vermuten, dass bei der Athyreose auch eine Veränderung des Schwellenwertes zustande käme.

Betreffs dieses Punktes sprach schon Bailey (1919) aus, dass bei Hypothyreose die Zuckerausscheidungsschwelle gegen die Norm erhöht ist. Auch Falta (1928) vermutete auf Grund der Beobachtungen anderer Autoren, dass die alimentäre Hyperglykämie beim Myxoedem langsamer und ohne Glykosurie hervorzurufen abläuft, dass die Zuckerausscheidungsschwelle bei Hypothyreose erhöht ist, stellte jedoch keine eigenen Untersuchungen an. Um

diese Frage zu entscheiden, habe ich die folgenden Versuche unternommen.

Bei diesen Untersuchungen entfernte ich an den Kaninchen, nachdem ich ihren Schwellenwert durch obengenannte Methode bestimmt hatte, die Schilddrüse unter sorgfältigen Kautelen, um weder Epithelkörperchen noch Nervi recurrentes zu schädigen. Nach dieser Operation wurde die Zuckerausscheidungsschwelle wieder bestimmt.

Tabelle XXII.

Versuch I. Kaninchen Nr. 32, 2790 g.

Datum	Zuckermenge g	Blutzuckergehalt mg % (Harnzucker %)						Schwellenwert %
		Vor	½ Std.	1	1½	2	3	
11. VII	4.2	106 (–)	141	198 (–)	171	156 (–)	110 (–)	über 0.20
18. „	4.8	112 (–)	185	223 (Spur)	217	186 (Spur)	133 (–)	0.22
23. „	4.5	114 (–)	160	213 (–)	206	196 (Spur)	123 (–)	0.21
29. VII	Thyreoidektomie							
30. VII	5.6	113 (–)	183	212 (–)	214	217 (Spur)	150 (Spur)	0.21
1. VIII	4.2	115 (–)	160	196 (Spur)	168	135 (Spur)	120 (–)	0.19
3. „	4.7	108 (–)	159	175 (–)	156	121 (Spur)	102 (–)	0.17
5. „	5.1	112 (–)	147	162 (–)	148	132 (Spur)	105 (–)	0.16
10. „	6.6	117 (–)	161	151 (Spur)	146	143 (–)	121 (–)	0.16

Wie man aus der Tabelle ersieht, war der Schwellenwert im normalen Zustand 0,21–0,22%, während er nach der Operation im Laufe der Zeit allmählich bis auf 0,16% herabstieg. Ich bedauere es sehr, dass ich den weiteren Verlauf nicht verfolgen konnte, weil das Tier am 13. Aug. fortlief.

Die Zuckerassimilationskraft wurde, wie die Tabelle zeigt, nach der Operation im allgemeinen deutlich gesteigert. Hier ist noch zu bemerken, dass die Herabsetzung des Schwellenwertes am

nächsten Tag nach der Operation noch nicht, sondern erst nach einigen Tagen zum Ausdruck kam.

Tabelle XXIII.

Versuch II. Kaninchen Nr. 33, 2460 g.

Datum	Zuckermenge g	Blutzuckergehalt mg% (Harnzucker %)						Schwellenwert %
		Vor.	½ Std.	1	1½	2	3	
25. VII.	1.8	110 (–)	195	220 (Spur)	187	153 (–)	120 (–)	0.22
1. VIII.	2.0	109 (–)	223	219 (Spur)	186	134 (–)	124 (–)	0.22
6. VIII.		Thyreoidektomie						
7. VIII.	1.8	112 (–)	200	190 (0.52)	175	161 (0.45)	133 (Spur)	unter 0.20
9. „	2.7	115 (–)	185	202 (2.45)	197	182 (1.90)	145 (Spur)	weit unter 0.20
10. „	2.0	109 (–)	152	139 (Spur)	141	130 (–)	100 (–)	0.15
15. „	3.3	118 (–)	151	170 (–)	177	134 (Spur)	112 (–)	0.17
24. „	4.3	108 (–)	163	182 (–)	176	145 (Spur)	108 (–)	0.18

Bei diesem Tier war die Zuckerausscheidungsschwelle vor der Thyreoidektomie 0,22%, stieg nach der Operation in 4 Tagen bis auf 0,15% herab, um dann später die Neigung zu zeigen, wieder allmählich zum normalen Wert zurückzukehren.

Die Zuckerassimilationskraft wurde auch hier, wie die Tabelle zeigt, auffallend erhöht.

Wie Tabelle XXIV zeigt, betrug der Schwellenwert im normalen Zustande 0,17–0,18%, während er sich nach der Thyreoidektomie beträchtlich erniedrigte (0,13%), um dann später wieder zum früheren Werte zurückzukehren. Die Assimilationsgrenze für Zucker scheint hier nicht gesteigert zu sein. Von einer Herabsetzung ist auch keine Rede. Es ist bemerkenswert, dass die alimentäre Hyperglykämie nach der Operation schneller ablief, und dass man dabei auch die hypoglykämische Phase beobachten konnte. Bei solcher Sachlage könnte man wohl vermuten, dass die Zuckerassimilationskraft auch hier etwas erhöht sein dürfte.

Tabelle XXIV.

Versuch III. Kaninchen Nr. 33, 2340 g.

Datum	Zuckerzufuhr g	Blutzuckergehalt mg % (Harnzucker %)						Schwellenwert %
		Vor	½ Std.	1	1½	2	3	
23. VII	6.6	95 (–)	152	183 (Spur)	167	146 (–)	114 (–)	0.18
27. „	6.6	97 (–)	163	178 (Spur)	169	147 (–)	118 (–)	0.17
30. „	7.0	93 (–)	179	189 (Spur)	165	138 (Spur)	105 (–)	0.18
2. VIII	Thyreoidektomie							
4. VIII	5.4	89 (–)	124	138 (Spur)	139	125 (0.61)	118 (Spur)	unter 0.13
5. „	5.1	86 (–)	127	130 (–)	138	120 (Spur)	90 (–)	0.13
7. „	5.1	90 (–)	147	154 (Spur)	141	120 (–)	84 (–)	0.15
9. „	5.4	98 (–)	138	159 (Spur)	134	102 (–)	79 (–)	0.15
13. „	6.3	95 (–)	167	172 (Spur)	136	105 (–)	82 (–)	0.17

Weitere zwei Versuche wurden in gleicher Weise angestellt. (Tabelle XXV).

Tabelle XXV.

Versuch IV.			Versuch V.		
Kaninchen Nr. 35, 2130 g.			Kaninchen Nr. 36, 2260 g.		
Datum	Zuckerzufuhr g	Schwellenwert %	Datum	Zuckerzufuhr g	Schwellenwert %
17. VIII	4.8	0.17	3. IX.	6.0	über 0.18
21. „	4.8	0.18	7. „	6.3	0.19
26. „	Thyreoidektomie		10. „	6,0	0.19
27. „	4.2	0.16	12. „	Thyreoidektomie	
29. „	3.9	unter 0.15	13. „	6.6	0.18
31. „	3.6	0.16	15. „	5.8	0.16
3. IX	4.5	0.18	17. „	6.0	0.16
			19. „	6.0	0.17
			24. „	6.3	0.17

Der Übersichtlichkeit halber gebe ich die Untersuchungsresultate in einer Tabelle XXVI zusammengestellt.

Tabelle XXVI.

Nr.	Zuckerausscheidungsschwelle %		
	Vor der Operation	nach der Operation	
		Anfangs	Später
I	0.21 - 0.22	0.19—0.21	0.16
II	0.22	0.15—unter 0.20	0.18
III	0.17—0.18	0.13	0.17
IV	0.17—0.18	unter 0.15—0.16	0.18
V	0.19	0.16	0.17

Aus dieser Tabelle ersieht man, dass der Schwellenwert durch die Thyreoidektomie, im Gegensatz zu den Ansichten von Bailey (1919) und Falta (1928), in allen Fällen mehr oder minder auffallend erniedrigt war. Dabei beobachtete ich in den meisten Fällen (Versuch I, II, IV und V), dass die Erniedrigung des Schwellenwertes am nächsten Tag nach der Thyreoidektomie, an welchem der Einfluss der Operation selbst am stärksten sein muss, eher schwächer (bei Versuch I war der Schwellenwert sogar gar nicht beeinflusst) zum Ausdruck kam, um dann bald auffallend niedrig zu werden. Diese Erscheinung erlaubt es wohl, die Erniedrigung des Schwellenwertes nicht als direkte Folge des operativen Eingriffs zu betrachten, sondern auf den Ausfall der Schilddrüsenfunktion zurückzuführen, weil am ersten Tag nach der Operation der Schilddrüsenstoff im Organismus noch reichlicher als in der späteren Zeit zurückgeblieben sein, oder dabei die Umstimmung des Organismus noch nicht genügend stattgefunden haben dürfte.

Im weiteren Verlauf zeigte der durch Thyreoidektomie erniedrigte Schwellenwert in den meisten Fällen (Versuch II, III, IV, u. V) die Neigung, allmählich zum normalen Werte zurückzukehren. Nach diesem Befund lässt sich wohl vermuten, dass im Laufe der Zeit eine Kompensation durch andere Organe mit ähnlicher Funktion zustande kommt.

Ausserdem wurde die Zuckerassimilationsgrenze in manchen Fällen, wie schon bei den einzelnen Fällen erwähnt, mit den Ansichten von Knöpfelmacher (1904), Eppinger, Falta und Rudinger (1908) und Frontali (1913) übereinstimmend, erhöht gefunden.

Zusammenfassung.

1. Durch die perorale Darreichung von Thyreoideum siccum wurde die Steigerung der Zuckerausscheidungsschwelle und die Herabsetzung der Zuckerassimilationskraft in den meisten Fällen beobachtet.

2. Durch die einmalige Injektion von Thyroxin kam die Erhöhung der Zuckerausscheidungsschwelle stets zur Erscheinung. Dabei wurde häufig eine Verschlechterung der Zuckerassimilation beobachtet.

3. Durch die Thyreoidektomie fand ich immer eine Erniedrigung der Zuckerausscheidungsschwelle und manchmal eine Erhöhung der Zuckerassimilationskraft.

III. Einfluss der Funktion der Hypophyse auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

Es ist wohl allgemein bekannt, dass der allgemeine Stoff- und Kraftwechsel durch Funktionsänderungen der Hypophyse eine Veränderung gegenüber der Norm erleidet. Dies tritt zunächst im Kohlenhydratstoffwechsel hervor, worüber verschiedene Ansichten ausgesprochen wurden. So fand Aschner (1912, 1929), dass bei hypophysipriven Hunden die Adrenalinglykosurie oft ganz ausbleibt oder nur in schwächerem Grad vorkommt, und die alimentäre Glykosurie stark herabgesetzt wird. Falta (1909) beobachtete, dass die mit Hypophysenauszügen vorbehandelten Hunde auf Adrenalin mit auffallend starker Glykorurie reagierten, während andere Autoren (Böe, 1914; Laurin, 1917; Burn, 1923) dagegen eher eine die Adrenalinglykogenolyse hemmende Wirkung fanden. Manche Autoren (Crowe, Cushing & Homans, 1910; Keeton & Becht, 1919) sahen sehr oft nach der Hypophysenentfernung eine Hyperglykämie und Glykosurie auftreten.

Auch über den Einfluss der Hypophyse auf die Zuckertoleranz sind die Ansichten der Autoren nicht einig. So beobachteten Borchardt (1908), Franchini (1910) und Burn (1923), dass bei Injektion von Hinterlappenextrakt eine starke Hyperglykämie und Glykosurie auftraten. Die Hyperglykämie klang aber meist rasch ab, ohne zur Glykosurie zu führen, was wohl vermuten lässt, dass die Zuckerausscheidungsschwelle dabei erhöht ist. Andere Autoren (Dresel, 1914; Stenström, 1914) aber hatten die beiden Erscheidungen vermisst. Cushing und Jacobson (1911) fanden nach der Hypophysenentfernung eine Steigerung der Zuckertoleranz, die dagegen von Geiling (1927) nicht bestätigt wurde. Nach Cushing (1912) soll die subcutane oder intravenöse Zufuhr von Hinterlappenextrakt die Toleranz für Kohlenhydrat herabsetzen, wofür auch die Angabe von Hiness, Leese und Boyd (1927) spricht. Dagegen beobachtete Bernstein (1914) dabei keine Toleranzabnahme.

Alle diese Autoren zogen bei ihren Schlussfolgerungen über den Einfluss der Hypophyse auf die Zuckertoleranz die Zuckerausscheidungschwelle nicht in Betracht.

Da es jedenfalls nicht bezweifelt werden kann, dass die Zuckertoleranz mehr oder weniger durch die Hypophysenfunktion beeinflusst wird, so darf man aus meinen vorangehenden Versuchen wohl erwarten, dass dabei auch eine Veränderung der Zuckerausscheidungschwelle auftritt.

Um die Frage klar zu stellen, habe ich die folgenden Untersuchungen unternommen.

Bekanntlich besteht die Hypophyse aus Hinter-, Vorder- und Mittelappen und Pars tuberalis. Diese sind sowohl entwicklungsgeschichtlich als auch funktionell voneinander ganz verschieden. Ich habe deshalb in meinen Untersuchungen den Einfluss der einzelnen Teile der Hypophyse auf die Zuckerausscheidungsschwelle studiert.

1. Einfluss der Hinterlappenstoffe auf die Zuckerausscheidungsschwelle.

Dass die Hinterlappenstoffe bei dem Kohlenhydratstoffwechsel

eine grosse Rolle spielen, wurde wie oben erwähnt von vielen Seiten ausgesprochen, ohne dass dabei die Angaben miteinander übereinstimmten. Auch ihr Einfluss auf die Zuckerausscheidungsschwelle wurde nicht untersucht.

Bei dieser Sachlage führte ich die folgenden Versuche aus, um diese Frage zu beleuchten.

Ich bestimmte zuerst an Kaninchen ihre Zuckerausscheidungsschwelle im normalen Zustand. Dann wurden an einem Tag 2 ccm Pituitrin (Parke, Davis & Co.) subcutan injiziert, und nach 30–40 Minuten Zucker dargereicht, um den Einfluss von Pituitrin auf die Schwelle zu studieren. Auch an den dem Pituitrinversuch folgenden Tagen wurde die Zuckerausscheidungsschwelle wiederholt bestimmt und mit der am Pituitrin-Tag verglichen.

Tabelle XXVII.

Versuch I. Kaninchen Nr. 37, 2380 g.

Datum	Zuckerzufuhr g	Pituitrin ccm	Blutzucker mg% (Harnzucker %)						Schwellenwert %
			Vor der Inj.	Vor der Füttg.	½ Std.	1.	1½	2	3	
4. I.	3,6			98 (–)	203	215 (Spur)	174	130 (–)	95 (–)	0.21
8. "	3,6			95 (–)	180	210 (Spur)	206	199 (Spur)	142 (–)	0.21
10. "	2,0	2.0	102 (–)	123 (–)	138	152 (Spur)	153	130 (0.48)	128 (Spur)	unter 0.15
12. "	3,6			108 (–)	178	243 (Spur)	245	228 (Spur)	140 (–)	0.24
13. "	3,6			105 (–)	228	268 (Spur)	219	176 (Spur)	131 (–)	0.26
15. "	3,6			110 (–)	191	253 (Spur)	235	189 (Spur)	125 (–)	0.25
17. "	3,6			102 (–)	188	235 (Spur)	218	179 (–)	138 (–)	0.23
18. "	3,6			98 (–)	183	227 (–)	218	165 (Spur)	125 (–)	0.22
20. "	3,6			101 (–)	168	212 (–)	197	162 (Spur)	115 (–)	0.21

Wie die Tabelle zeigt, betrug der Schwellenwert im normalen Zustand 0,21%. Am Pituitrin-Tag war der nüchterne Blutzuckergehalt 0,102%, der 30 Min. nach der Injektion von 2 ccm Pituitrin

Tabelle XXVIII.

Versuch II.				Versuch III.				Versuch IV.				Versuch V.			
Kaninchen Nr. 38, 2200 g.				Kaninchen Nr. 39, 2180 g.				Kaninchen Nr. 40, 2210 g.				Kaninchen Nr. 41, 2430 g.			
Datum	Zuckermenge (g)	Pituitrin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckermenge (g)	Pituitrin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckermenge (g)	Pituitrin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckermenge (g)	Pituitrin (ccm)	Schwellenwert (%)
8. I.	3.0		0.17	10. I.	4.5		0.19	11. I.	4.5		über 0.19	25. I.	5.1		0.19
11. „	3.1		0.17	14. „	4.5		0.18	17. „	4.8		0.21	30. „	5.4		0.19
14. „	1.5	2.0	unter 0.13	16. „	1.3	2.0	weit-unter 0.17	23. „	4.5		über 0.19	2. II	0.9	2.0	unter 0.16
15. „	4.1		0.22	18. „	3.6	0.21	über 0.21	28. „	0.9	2.0	unter 0.13	3. „	6.3		0.23
16. „	4.5		0.23	19. „	4.5		0.22	29. „	4.5		über 0.23	5. „	5.7		0.20
19. „	3.6		0.18	20. „	4.5		0.18	31. „	4.5		0.20				
Blutzuckergehalt am Pituitrin-Tag im nüchternen Zustande (mg %)	Vor der Injektion 105						92				100				106
	nach der Injektion 130						95				124				124

auf 0,123% anstieg. Der Schwellenwert wurde am Pituitrin-Tag deutlich erniedrigt (unter 0,15%), aber an den folgenden Tagen auffallend über den ursprünglichen Wert (0,26%) gesteigert, um dann allmählich wieder abzusinken.

Die Zuckertoleranz war am Pituitrin-Tag deutlich verringert, blieb aber an den anderen Tagen gleichmässig gross.

Weil aber die Zuckerzufuhr, abgesehen vom Pituitrin-Tag, immer gleich gehalten wurde, ging die Störung der Zuckerassimilationskraft mit der Steigerung der Zuckerausscheidungsschwelle ganz parallel.

Ich stelle die Versuche II–V in einer Tabelle zusammen. (Tabelle XXVIII).

Tabelle XXIX.

Versuch VI. Kaninchen Nr. 42, 2250 g.

Datum	Zucker-zufuhr g	Pituit-rin ccm	Blutzucker mg% (Harnzucker %)						Schwel-lenwert %
			Vor der Inj.	Vor der Füttg.	½ Std.	1	1½	2	3	
22. I.	3,3			108 (–)	182	195 (Spur)	160	149 (–)	115 (–)	0.19
24. "	3,6			110 (–)	216	218 (Spur)	177	147 (–)	122 (–)	0.21
28. "	0	2,0	101 (–)	104 (–)	76	80 (–)	74	51 (Spur)	65 (–)	0.08 über
29. "	5,4			93 (–)	180	223 (–)	253	244 (–)	201 (–)	0.25
30. "	4,8			98 (–)	212	258 (Spur)	267	204 (Spur)	189 (–)	0.26
2. II.	3,6			108 (–)	196	241 (Spur)	210	160 (Spur)	132 (–)	0.24
5. "	3,6			110 (–)	176	212 (Spur)	200	162 (Spur)	122 (–)	0.21

In der Tabelle XXX habe ich meine Untersuchungsresultate übersichtlich zusammengestellt.

Wie die Tabelle XXX zeigt, wurde der Schwellenwert am Pituitrintag in allen Fällen erheblich erniedrigt, aber er stieg immer danach einige bis mehrere Tage lang stark an, um dann wieder allmählich zum ursprünglichen Wert zurückzukehren.

Die Zuckertoleranz nahm in Übereinstimmung mit der Ansicht

Tabelle XXX.

Nr.	Blutzuckergehalt mg % am Tage der Injektion im nüchternen Zustande.			Zuckerausscheidungsschwelle %				
				Vor der Injektion	Am Tage der Injektion		in den folgenden Tagen (max. Wert.)	
	Vor der Injektion	Vor der Fütterung	Erhöhung		Schwelle	Erniedrigung	Schwelle	Erhöhung
I.	102	123	21	0.21	unter 0.15	über 0.06	0.26	0.05
II.	105	130	25	0.17	unter 0.13	über 0.04	0.23	0.06
III.	92	95	3	0.18–0.19	weit unter 0.17	weit über 0.02	0.22	0.03–0.04
IV.	100	124	24	0.20–0.21	unter 0.13	über 0.07–0.08	über 0.23	über 0.02–0.03
V.	106	124	18	0.19	unter 0.16	über 0.03	0.23	0.04
VI.	101	104	3	0.19–0.21	0.08	0.11–0.13	0.26	0.05–0.08

von Cushing (1912) und Heines, Leese & Boyd (1927) am Pituitrintag in allen Fällen stark ab. Dann stieg sie aber in der Hälfte der Fälle (II, IV und V) über den ursprünglichen Wert an, während sie bei der anderen sofort zum früheren Wert zurückkehrte.

Die Zuckerassimilationskraft schien in der Hälfte der Fälle am Pituitrintag (Versuch III, IV und V) und an den folgenden Tagen (Versuch I, III und IV) vermindert zu sein.

Der nüchterne Blutzuckergehalt stieg durch Pituitrin, mit den Angaben von Borchardt (1908), Franchini (1910) und Burn (1923) übereinstimmend, in 4 Fällen innerhalb 40 Min. nach der Injektion deutlich an. In einem Fall (Versuch III) aber blieb der Nüchternwert unverändert, und nur in einem andern Fall (Versuch VI), bei dem während des ganzen Versuches kein Zucker dargereicht wurde, stieg er nicht an, sondern sank bis auf 0,051%. Dass der Schwellenwert in den der Pituitrininjektion folgenden Tagen immer erhöht und die Zuckerassimilationskraft dabei in manchen Fällen herabgesetzt wurde, ist kein unerwartetes Ergebnis, weil Falta (1909) und Bernstein und Falta (1912) angeben, der Hinterlappenextrakt auf die Kohlensäureproduktion, den Sauerstoffverbrauch, den Eiweiss- und Salzstoffwechsel ganz gleich wirkt wie Schilddrüsenstoffe und Adrenalin, welch' beide ebenfalls den Schwellenwert und die Zuckerassimilationskraft bei meinen vorangehenden Versuchen in gleicher Weise wie hier beeinflussten.

Die Erniedrigung des Schwellenwertes am Pituitrintag dagegen ist schwer zu verstehen und bliebe vorläufig dahingestellt.

Es sei hier noch erwähnt, dass man, ohne die Zuckerausscheidungsschwelle in Betracht zu ziehen, nicht verstehen könnte, warum die Zuckerassimilationskraft in diesen Versuchen bei gleich grosser Zuckertoleranz eher herabgesetzt ist (Versuch I, III und IV) oder warum ohne Steigerung der Zuckerassimilationskraft auch eine Erhöhung der Zuckertoleranz zum Ausdruck kommt (Versuch II, V und VI).

2. *Einfluss der Vorderlappenstoffe auf die Zuckerausscheidungsschwelle.*

Dass der Vorderlappen der Hypophyse auf das Wachstum und den Stoffwechsel eine gewisse Einwirkung ausübt, ist wohl bekannt. Weil ich bei den vorangehenden Untersuchungen beobachtete, dass der Hinterlappenextrakt auf die Zuckerausscheidungsschwelle, Zuckerassimilationskraft sowie Zuckertoleranz einen deutlichen Einfluss ausübt, so liess sich erwarten, dass der Vorderlappenextrakt auch auf sie irgend einen Einfluss ausübt.

Um diese Vermutung zu bestätigen, habe ich die folgenden Versuche angestellt.

Bei diesen Versuchen injizierte ich den Kaninchen, deren Zuckerausscheidungsschwelle vorher bestimmt war, 5 ccm Antuitrin (Parke, Davis & Co.) 30–60 Min. vor der Zuckerfütterung subcutan und bestimmte den Schwellenwert an demselben Tage und an den folgenden Tagen.

Tabelle XXXI.

Versuch I. Kaninchen Nr. 43, 2380 g.

Datum	Zucker-zufuhr g	Antui-trin ccm	Blutzucker mg% (Harnzucker %)						Schwel-lenwert %
			Vor der Inj.	Vor der Füttg.	½ Std.	1	1½	2	3	
4. I.	3,6			98 (–)	203	215 (Spur)	174	130 (–)	95 (–)	0,21
8. "	3.6			95 (–)	180	210 (Spur)	203	199 (Spur)	142 (–)	0,21
20. "	3,6			101 (–)	168	212 (–)	197	162 (Spur)	115 (–)	0,21
6. II.	2,4	5,0	98 (–)	95 (–)	136	126 (Spur)	100	96 (0,60)	94 (0,48)	unter 0,13
8. "	3,6			102 (–)	145	150 (–)	147	122 (Spur)	104 (–)	0,15
10. "	3,6			107 (–)	170	178 (Spur)	165	132 (–)	115 (–)	0,17
12. "	3,6			105 (–)	189	212 (Spur)	213	170 (Spur)	134 (–)	0,21
15. "	0	5,0	109 (–)	93	94 (–)	97	99 (0,38)	104	102 (–)	0,09

Bei diesem Tier betrug der Schwellenwert, wie die Tabelle

XXXI zeigt, im normalen Zustand 0,21%, während er durch die Antuitrininjektion am 6. Febr. niedriger als 0,13% wurde und sich am 15. Febr. sogar auf 0,09% senkte. Dann stieg er allmählich wieder bis auf den ursprünglichen Wert. Die Zuckertoleranz nahm am Antuitrintag zwar stark ab; aber bald darauf zeigte sie wieder den früheren Wert.

Die Zuckerassimilationskraft stieg an den der Injektion folgenden Tagen vollständig parallel mit der Herabsetzung der Zuckerausscheidungsschwelle, weil die Zuckerzufuhr immer gleich gehalten wurde.

Die Versuche II–VI wurden in einer Tabelle XXXII zusammengestellt.

Hier stelle ich meine Versuchsresultate übersichtlich in der Tabelle XXXIII zusammen.

Wie man aus dieser Tabelle ersehen kann, wurde die Zuckerausscheidungsschwelle in allen Fällen am Antuitrintag erheblich erniedrigt. Diese Erscheinung wurde auch an den darauf folgenden Tagen in der Hälfte der Fälle beobachtet, obwohl sie im Grad allmählich nachliess. Jedenfalls wurde eine Erhöhung des Schwellenwertes nie gesehen. Die Zuckertoleranz wurde in allen Fällen am Antuitrintag sehr auffallend herabgesetzt; aber später zeigte sie wieder den früheren Wert.

Die Zuckerassimilationskraft stieg an den der Injektion folgenden Tagen bei der Hälfte der Fälle (Versuch I, II und VI) an, während sie bei den anderen unverändert blieb.

Dieses den Pituitrinversuchen gegenüber entgegengesetzte Verhalten der Zuckerausscheidungsschwelle und Zuckerassimilationskraft kann man nach der Ansicht von Falta und seinen Mitarbeitern, welche bezüglich der Wirkung auf das vegetative Nervensystem im Vorderlappenextrakt einen Antagonisten gegen den Hinterlappenextrakt sehen wollten, wohl leicht verstehen.

Meine Untersuchungsresultate werden auch durch die Angabe von Nakayama (1924), dass bei der Schwangerschaft die Zuckerausscheidungsschwelle niedriger als sonst ist, gestützt, weil bekanntlich bei der Schwangerschaft Hypertrophie des Hypophysenvorderlappens auftritt, und die Zufuhr von Vorderlappenstoffen die

Tabelle XXXII.

Versuch II.				Versuch III.				Versuch IV.				Versuch V.				Versuch VI.			
Kaninchen Nr. 44, 2160 g.				Kaninchen Nr. 45, 2180 g.				Kaninchen Nr. 46, 2110 g.				Kaninchen Nr. 47, 2430 g.				Kaninchen Nr. 48, 2200 g.			
Datum	Zuckerzufuhr (g)	Antuitrin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckerzufuhr (g)	Antuitrin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckerzufuhr (g)	Antuitrin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckerzufuhr (g)	Antuitrin (ccm)	Schwellenwert (%)	Datum	Zuckerzufuhr (g)	Antuitrin (ccm)	Schwellenwert (%)
23. II.	8.9		0.18	10. I.	4.5		0.19	17. I.	4.8		0.21	16. II.	5.4		0.21	9. II.	3.0		0.17
26. „	8.7		0.18	20. „	4.5		0.18	23. „	4.5		über 0.19	18. „	5.7		0.22	13. „	3.1		0.17
6. III.	6.0	5.0	unter 0.15	25. „	0	5.0	0.09	31. „	4.5		0.20	21. „	2.1	5.0	unter 0.14	21. „	3.3		0.18
7. „	8.7		0.16	26. „	4.5		0.19	13. II	1.0	5.0	über 0.13	22. „	6.0		0.22	28. „	1.8	5.0	unter 0.15
9. „	8.7		0.18	27. „	4.5		0.18	14. „	4.0		0.21	23. „	5.7		0.22	1. III.	3.0		0.16
								15. „	4.2		0.20					2. „	3.3		0.18
Blutzuckergehalt am Antuitrin-Tag im nüchternen Zustande (mg %)	Vor d. Injek. 98						109				109				98				102
	nach d. Injek. 102						97				112				96				122

TABELLE XXXIII.

Nr.	Blutzucker mg % am Tage der Injektion		Zukerausscheidnugsschwelle %					
	Vor der Injektion	Vor der Fütterung	Vor der Injektion	Am Tage der Injektion		in den folgenden Tagen (min. Wert)		Priapismus
				Schwelle	Erniedrigung	Schwelle	Erniedrigung	
I.	98 109	95 93	0.21	unter 0.13 und 0.09	über 0.08 und 0.12	0.15	0.06	−
II.	98	102	0.18	unter 0.15	über 0.03	0.16	0.02	+
III.	109	97	0.18–0.19	0.09	0.09–0.10	0.18	0	+
IV.	109	112	0.20–0.21	unter 0.13	über 0.07–0.08	0.20	0	+
V.	98	96	0.21–0.22	unter 0.14	über 0.07–0.08	0.22	0	−
VI.	102	122	0.17–0.18	unter 0.15	über 0.02–0.03	0.16	0.01–0.02	+

vermehrte Bildung gelber Körper im Ovarium nach sich zieht.

Ausserdem scheinen meine Untersuchungsresultate mit denen von Kawashima (1927) im Zusammenhang zu stehen, der neuerdings beobachtete, dass der Schwellenwert durch die Kastration des Hodens erhöht wird, da die Funktion dieses letzteren Organs durch die Transplantation des Hypophysenvorderlappens bezw. durch Vorderlappen-Extrakteinspritzung gesteigert wird (Zondek und Aschheim, 1928; Voss und Lowe, 1928; Smith, 1927).

Der nüchterne Blutzuckergehalt wurde im allgemeinen durch das Antuitrin innerhalb 30–60 Min. nach der Injektion nicht besonders beeinflusst, abgesehen davon, dass er im Versuch VI leicht gesteigert wurde.

Es ist noch zu erwähnen, dass ich durch die Antuitrininjektion in den meisten Fällen (Versuch II, III, IV und VI) einen oft einige Tage dauernden Priapismus beobachtete, welcher mich bei der Urinkatheterisation sehr belästigte. Diese Erscheinung hängt möglicherweise mit der Funktion des Hypophysenvorderlappens zusammen, die die innersekretorische Leistung der Keimdrüsen fördern kann.

Zusammenfassung.

1. Der Schwellenwert wurde durch das Pituitrin am Tage der Injektion in allen Fällen erniedrigt, während er an den darauf folgenden Tagen immer deutlich anstieg, um dann zum früheren Wert wieder zurückzukehren.

2. Die Zuckertoleranz sank am Pituitrintag in allen Fällen stark nach unten; aber sie nahm bald darauf in der Hälfte der Fälle über den ursprünglichen Wert zu.

3. Die Zuckerassimilationskraft wurde durch die Pituitrininjektion häufig vermindert.

4. Der nüchterne Blutzuckergehalt stieg durch die Pituitrininjektion in den meisten Fällen schon innerhalb 40 Min. an. In einem Fall aber, bei dem kein Zucker dargereicht wurde, stieg er nicht an, sondern verminderte sich deutlich.

5. Der Schwellenwert wurde durch die subcutane Antuitrin-

Tabelle XXXIV.

Organ	Organteile	Funktionsrichtung	Versuchsweise	Einfluss auf	
				Zuckerausscheidungs-schwelle	Zuckerassimilations-kraft
Nebenniere	Rinde	Hyperfunktion	Transplantation der Nebennieren-rinde	herabsetzend	steigernd
		Hypo-resp. A-Funk-tion	Kauterisation der Rinde	steigernd	manchmal herabsetzend
	Mark	Hyperfunktion	Adrenalin-Injektion	steigernd	
		Hypo resp. A-Funk-tion	Kauterisation des Markes	herabsetzend	
Schilddrüse		Hyperfunktion	Darreichung von Thyreoid. sicc. oder Thyroxin	steigernd	herabsetzend
		Hypo- resp. A-Funk-tion	Thyreoidektomie	herabsetzend	steigernd
Hypophyse	Hinter-lappen	Hyperfunktion	Pituitrin-Injektion	Am Pituitrin-Tage herab-setzend, an den folgenden Tagen steigernd	herabsetzend
	Vorder-lappen	Hyperfunktion	Antuitrin-Injektion	herabsetzend	steigernd

injektion immer deutlich erniedrigt. Diese Erscheinung konnte in der Hälfte der Fälle auch an den darauf folgenden Tagen beobachtet werden.

6. Die Zuckertoleranz wurde in allen Fällen am Antuitrintag stark herabgesetzt; aber bald darauf zeigte sie wieder den früheren Wert.

7. Die Zuckerassimilationskraft stieg an den der Antuitrininjektion folgenden Tagen bei der Hälfte der Fälle an, während sie bei der anderen unverändert blieb.

8. Der nüchterne Blutzuckergehalt wurde im allgemeinen durch das Antuitrin innerhalb 30–60 Min. nicht besonders beeinflusst.

9. In den meisten Fällen wurde nach der subcutanen Injektion von Antuitrin Priapismus beobachtet.

Schluss.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit wurden schon am Ende jedes Kapitels im einzelnen zusammengefasst. Wenn man aber die innigen Beziehungen, die zwischen den verschiedenen endokrinen Organen bestehen, in Betracht zieht, erscheint es sehr wünschenswert, alle Resultate zusammenfassend noch einmal hier wiederzugeben. Zu diesem Zweck dient die Tabelle XXXIV.

Aus dieser Tabelle kann man folgendes schliessen:

1. Die Hyperfunktion der Nebennierenrinde und des Hypophysenvorderlappens wirkt auf die Zuckerausscheidungsschwelle herabsetzend.

2. Die Hyperfunktion des Nebennierenmarks, der Schilddrüse und, wenn man von dem Pituitrintag absieht, auch des Hypophysenhinterlappens wirkt auf den Schwellenwert steigernd.

3. Die Hypo- resp. A-Funktion der Nebennierenrinde ruft Schwellenwertanstieg hervor.

4. Die Hypo- resp. Afunktion des Nebennierenmarks und der Schilddrüse setzt den Schwellenwert herab.

5. Aus diesen Ergebnissen kann man weiter folgern, dass hinsichtlich der Zuckerausscheidungsschwelle die Nebennierenrinde und der Hypophysenvorderlappen gegenüber dem Nebennieren-

mark, der Schilddrüse und dem Hypophysenhinterlappen ein antagonistisches Verhalten zeigen.

6. Die Veränderung des Schwellenwertes geht in den meisten Fällen mit der der Zuckerassimilationskraft Hand in Hand, indem die Steigerung des ersteren von einer Herabsetzung der letzteren begleitet wird, und umgekehrt.

LITERATUR.

Aschner, B. (1912): Pflügers Arch., **146**, 1.
Ascher, B. (1929): Handb. d. inn. Sekr., **2**, Lfg. 2, 349.
Bailey (1919): Arch. of int. Med., **23**, 455.
Berghoff (1924): Journ. of amer. med. Assoc., **83**, 1308.
Bernstein (1914): Zeitschr. exp. Pathol. u. Therap., **15**, 86.
Bernstein & Falta (1912): Verhandl. d. deutsch. Kongr. f. inn. Med., 536.
Bertram & Bornstein (1923): Zeitschr. f. d. ges. exp. Med., **37**, 132.
Boe (1914): Biochem. Zeitschr., **64**, 450.
Borchardt (1908): Zeitschr. f. kl. Med., **66**, 332.
Burn (1923): Journ. of Physiol., **57**, 318.
Crowe, Cushing & Homans (1910): Johns Hopkins Hosp. Bull., 127. zit. nach Amer. Journ. of Physiol., 1919, **49**, 253.
Cushing (1912): The pituitary body and its disorders. zit. nach Bernstein, Zeitschr. exp. Pathol. u. Therap., 1914, **15**, 115.
Cushing & Jacobson (1911): Bull. Hopkins Hosp., **22**, 165. zit. nach Trendelenburg, Die Hormone. 1929.
Dresel (1914): Zeitschr. exp. Pathol. u. Therap., **16**, 365.
Eda (1927): Journ. of Biochem., **7**, 53, 79, 319, 345.
Eda (1929): Journ. of Biochem., **11**, 13.
Eppinger, Falta & Rudinger (1908): Wien. klin. Wochenschr., Nr. 21, 752. Zeitschr. f. klin. Med., **66**, 1 und **67**, 380.
Falta (1909): Wien. klin. Wochenschr., Nr. 30.
Falta (1928): Die Erkrank. d. Blutdrüsen, 165.
Franchini (1910): Berl. klin. Wochenschr., 613, 670, 719.
Frontali (1913): Arch. internat. de Physiol. **13**, 432. zit. nach Handb. d. inn. Sekr., **2**, Lfg, 1.
Geilling (1927): Journ. of Pharmacol., **31**, 247.
Goldzieher (1928): Klin. Wochenschr., Nr. 24, 1124.
Hamman & Hirschman (1917): Arch. inter. Med., **20**, 761.
Hildebrandt (1921): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak., **90**, 142.
Hines, Leese & Boyd (1927): Amer. Journ. of Physiol., **81**, 27.
Iwanaga (1930): Journ. of Biochem., **12**, 195.
Kawashima (1927): Journ. of Biochem., **7**, 361, 379.

Kawashima (1928): Journ. of Biochem., **9**, 337.
Kawashima & Iwanaga (1929): Journ. of Biochem., **10**, 97, **11**, 293.
Keeton & Becht (1919): Amer. Journ. of Physiol., **49**, 248.
Kempmann & Clauditz (1929): Klin. Wochenschr., Nr. 13, 587.
Knöpfelmacher (1904): Wien. klin. Wochenschr., 244.
Laurin (1917): Biochem. Zeitschr., **82**, 87.
Lichtwitz (1926): Handb. d. inn. Med. v. Bergmann & Staehelin, **4**.
Nakayama (1924): Journ. of Biochem., **4**, 139, 185, 163.
Oda (1928): Nippon Naibunpitsu Zassi, **4**, 1068, 1197.
Pollak (1923): Ergebn. d. inn. Med., **23**.
Sakaguchi, Matsuyama & Nakayama (1924): Mitteil. d. med. Fakul. d. kaiserl. Universität zu Tokyo, **32**, 61.
Shim (1925): Journ. of Biochem., **5**, 333.
Shiozawa (1926): Zikken Igaku Zassi, **10**, 2.
Smith (1927): Proc. exp. Biol. a. Med., **24**, No. 4. zit. nach Trendelerburg, Die Hormone, 1929.
Steinitz (1929): Deutsch. med. Wochenschr., Nr. 21, 871.
Tokumitsu (1918): Nissin Igaku, **7**, 1099, 1253.
Voss & Loewe (1928): Pflügers Arch., **218**, 605.
Wiechmann (1929): Deutsch. Arch. f. klin. Med., **164**, 172.
Zondek & Aschheim (1928): Klin. Wochenschr., 831.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

BEITRAG ZUR KENNTNIS DES EINFLUSSES DER LICHTSTRAHLEN AUF DEN GESAMT-CHOLESTERINGEHALT DER HAUT.

Von

S. KAWAGUCHI.

(*Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu Universität zu Fukuoka. Direktor: Prof. Dr. K. Kodama*).

(Eingegangen am 23. September 1931)

Voriges Jahr habe ich aus der chemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses in Berlin einen Aufsatz "Über den Einfluss der Lichtstrahlen auf den Gesamtcholesteringehalt der Haut" veröffentlicht. Damals habe ich zuerst mit normalen Meerschweinchen gearbeitet, um den Gesamt-Cholesterinwert der normalen Haut zu ermitteln. Dann habe ich mit geschorenen Meerschweinchen Versuche gemacht, von denen die einen mehrere Tage hintereinander intensiver Sonnenbestrahlung ausgesetzt, die anderen ebenso mehrere Tage mittels der Höhensonne bestrahlt wurden. In beiden Versuchsreihen lagen die Gesamt-Cholesterinwerte sämtlich wesentlich höher als die der Kontrolltiere. Dieses Jahr habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Keizo Kodama untersucht, ob der Anstieg des Gesamt-Cholesterinwertes das freie Cholesterin, den Cholesterinester oder beide betrifft.

Als Versuchstiere dienten mir männliche Kaninchen von 2050 g bis 2450 g Körpergewicht. Ich ging bei meinen Versuchen so vor, dass ich bei denselben Individuen die bestrahlte Rückenhaut mit der nichtbestrahlten Rückenhaut in Bezug auf ihren Cholesterinwert verglich. Die Haare der Rückenhaut wurden möglichst kurz abgeschoren, eine Stelle der geschorenen Haut mit einer 3 mm dicken Bleiplatte abgedeckt. Die Bestrahlung erfolgte mittels der Höhensonne (Acme) 30 Minuten lang aus einem Abstand von 50 cm mit starkem Strom. Sofort nach der Bestrahlung wurden die Tiere durch Luftembolie getötet, und die Haut so abgetragen, dass ihr

keine Spur von Muskulatur und Unterhautfettgewebe anhaftete. Dann wurde die Haut mittels eines mit Äther getränkten Tupfers mehrmals kräftig abgerieben, um anhaftendes Fett und Schmutz zu entfernen, mit der Schere in dünne Streifen zerlegt, und diese wieder in möglichst kleine gleichgrosse Stückchen zerschnitten. Von dem gut durchgemischten Material wurden 3.000 g oder 2.000 g genau abgewogen und zur Cholesterinbestimmung verwandt. Gleichzeitig wurden 1.000 g abgewogen, um den Wassergehalt zu ermitteln.

Zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins bediente ich mich der gravimetrischen Methode von Fex, modifiziert von Onizawa (1929), indem ich bei der Bestimmung des freien Cholesterins, vor dessen Extraktion mit Äther, Aceton an Stelle des Alkohols dem Hydrolysat zusetzte und bei der Verseifung des Cholesterinesters die Haut mit gesättigter alkoholischer Lösung von Natriumcarbonat 6 Stunden in einem siedenden Wasserbad unter Vermeidung von Alkoholverlust erhitzte. Der Gehalt an Cholesterinester wurde wie üblich durch die Differenz zwischen dem Gesamt-Cholesteringehalt und dem Gehalte an freiem Cholesterin ermittelt. Der so gefundene Wert wurde dann auf 100 g Trockensubstanz umgerechnet.

Das Resultat findet sich in den folgenden Tabellen.

Hieraus ersieht man, dass der Cholesteringehalt der bestrahlten Haut stets grösser ist als der der nicht-bestrahlten.

Erwähnt sei hier, dass die bestrahlte Haut stets einen grösseren Wassergehalt als die nicht-bestrahlte hat. Daraus erklärt sich, dass bei dem Tier No. 1 der Wert des freien Cholesterins, auf 1,000 g rohes Material berechnet bei der bestrahlten Haut kleiner als bei der nicht-bestrahlten war, wenn er sich auch auf Trockensubstanz berechnet als grösser erwies.

Auch hier sieht man, dass die Cholesterinwerte des Esters der bestrahlten Haut stets höher als die der nichtbestrahlten sind.

Aus den Tabellen geht hervor, dass sofort nach der Bestrahlung die Haut ihren Cholesteringehalt an der betreffenden Stelle vermehrt, und zwar den an freiem Cholesterin im rohen Material um 11,06%, den auf Trockensubstanz berechneten um 36,99%, den

Tabelle I.
Freies Cholesterin

	In 1.000 g Haut enthaltenes Cholesterin (mg)	Wassergehalt %	Trockensubstanz %	Cholesteringehalt der Trockensubstanz mg %
bestrahlte Haut				
No. 1	1,556	71,91	28,09	553,9
No. 2	1,726	72,30	27,70	623,1
No. 3	1,297	62,54	37,55	345,2
No. 4	1,086	61,58	38,42	282,6
Mittelwert	1,416	67,06	32,94	451,2
bedeckte Haut				
No. 1	1,580	66,07	33,93	456,7
No. 2	1,653	65,54	34,46	479,7
No. 3	0,9724	61,95	38,05	255,6
No. 4	0,8947	60,77	39,23	229,3
Mittelwert	1,275	63,58	36,42	355,3

Tabelle II.
Cholesterinester

	In 1.000 g Haut enthaltenes Cholesterin (mg)	Wassergehalt %	Trockensubstanz %	Cholesteringehalt der Trockensubstanz mg %
bestrahlte Haut				
No. 1	0,187	71,91	28,09	66,6
No. 2	0,644	72,30	27,70	229,2
No. 3	0,304	62,54	37,55	80,9
No. 4	0,239	61,58	38,42	62,3
Mittelwert	0,344	67,06	32,94	109,8
bedeckte Haut				
No. 1	0,159	66,07	33,93	46,9
No. 2	0,495	65,54	34,46	148,5
No. 3	0,293	61,95	38,05	79,5
No. 4	0,126	60,77	39,23	32,0
Mittelwert	0,286	63,58	36,42	76,7

des Cholesterinesters im rohen Material um 28,4% und den auf Trockensubstanz berechneten um 43,16%. Der Menge nach ist der Anstieg des freien Cholesterins bei weitem höher als der des Cholesterinesters, aber das Verhältnis des Anstiegs ist bei dem letzteren höher.

Zusammenfassung.

1. Sofort nach der Bestrahlung durch die Höhensonne vermehrt die Haut sowohl ihren Cholesteringehalt als auch ihren Cholesterinestergehalt an der betreffenden Stelle.

2. Sofort nach der Bestrahlung durch die Höhensonne hat die bestrahlte Haut des Kaninchens stets einen grösseren Wassergehalt als die nicht bestrahlte.

LITERATUR.

Kawaguchi, S. (1930): Biochem. Zeischrift, **221**, 232.
Onizawa (1929): The Journal of Biochemistry, **10**, 45.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

STUDIEN ÜBER DEN GALLENSÄURENSTOFFWECHSEL.

(Begonnen und geleitet von S. Nakagawa.)

V. Über die Atophancholerese.

Von

ISAMU SAKAMOTO.

(*Aus der medizinischen Klinik der Kaiserlichen Universität zu Sapporo. Vorstand: Prof. Dr. S. Nakagawa.*)

(Eingegangen am 23. September 1931)

I. Einleitung.

Die Sekretion der Galle ist seit langem sehr genau untersucht worden, weil sie früher als die wichtigste Funktion der Leber angenommen wurde. Diese Untersuchungen bezogen sich jedoch fast ausschliesslich auf die sezernierte Menge der Galle. Der Stoffwechsel der Gallensäuren ist lange Zeit fast unberührt geblieben, und wenn auch einige Forscher die Untersuchung der Gallensäurensekretion unternahmen, so haben sie doch zu eindeutigen Resultaten nicht gelangen können. Dies beruhte bloss auf dem Mangel an einer einfachen Bestimmungsmethode der Gallensäuren. Seitdem Foster und Hooper (1919) nach einem ganz neuen Prinzip ihr gasometrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der gekuppelten Gallensäuren publizierten, hat die Forschung über Gallensäurenstoffwechsel seitens der Fosterschen Schule und anderer Autoren bedeutende Fortschritte gemacht. Diese Methode reicht jedoch nicht aus, wenn man mit quantitativ geringem Ausgangsmaterial zu arbeiten versucht. Raue (1926) hat inzwischen eine neue Mikromethode veröffentlicht; und weil seine Methode sehr einfach auszuführen ist, so wurde in unserem Laboratorium viel damit gearbeitet: so z. B. hat Kumekawa (1928) über den Gehalt an Gallensäuren im menschlichen Duodenalsafte bei verschiedenen Erkrankungen und Gondaira (1929)

bei künstlichem Pneumothorax an tuberkulösen Menschen gearbeitet. Hierbei ist Gondaira zu dem interessanten Ergebnisse gekommen, dass der Gallensäurengehalt des Duodenalsaftes direkt nach dem künstlichen Pneumothorax auffallend abnimmt, aber nach wenigen Tagen über die Norm deutlich zunimmt, um nachher wieder bis zum Anfangswerte herunterzukommen. Hieraus hat er die Annahme ausgesprochen, dass der künstliche Pneumothorax nicht bloss als Kollapstherapie auf die erkrankte Lunge wirke, sondern auch als eine Art Reiztherapie auf den ganzen Organismus zu betrachten sei.

1930 haben Nakagawa und Fujikawa (1930) eine sehr einfache exakte Extraktionsmethode für Gallensäuren in der Galle ausgearbeitet und damit eine neue kolorimetrische quantitative Bestimmungsmethode für Gallensäuren in der menschlichen und Hundegalle publiziert, welche, wie Sakamoto und Fujikawa bestätigten, bei der menschlichen und Hundegalle voll befriedigende Resultate ergibt. Deswegen haben wir hier das Wesen der Atophan-Cholerese zu erforschen versucht und zwar mit besonderer Rücksicht darauf, wie sich die Gallensäurensekretion dabei verhalte.

Dass Atophan eine intensive choleretische Wirkung auf die Leber auszuüben imstande ist, ist zuerst von Brugsch und Horsters(1923/24) beschrieben worden. Wenn wir ihre Angaben nachsehen, so wurden von ihnen an 4-Stunden-Gallen die Gallenmenge, das Bilirubin, der trockene Rückstand, das Eiweiss, der Schleimgehalt, die innere Reibung, die Viskosität und die Oberflächenspannung untersucht, und sie haben sich in bezug auf die Gallensäuren dahin ausgesprochen, dass diese, von der Messung der Oberflächenspannung her betrachtet, unter dem Einfluss des Atophans auffallend vermehrt sezerniert werden müssten.

Dass man durch Messung der Oberflächenspannung keinen sicheren Schluss auf den Gallensäurengehalt ziehen darf, ist kaum zu betonen; das ist schon von vielen Autoren scharf bestritten worden. Deswegen sind wir daran gegangen zu erforschen, ob das Atophan wirklich auf die Gallensäurensekretion vermehrend einwirkt.

II. Technik der Versuche.

Als Versuchstiere haben wir ausschliesslich Hunde benutzt. Manche Autoren haben Versuche an Kaninchen angestellt, aber nach unserer Erfahrung ist der Gallenfarbstoff bei Kaninchen nach der van den Berghschen Methode nicht zu bestimmen, und noch grössere Nachteile liegen darin, dass die Gallensäuren beim akuten Versuche ziemlich rasch abnehmen, was die Beurteilung der Versuche stark erschwert, und ausserdem darin, dass sich die Nakagawa-Fujikawasche rote Reaktion an Kaninchengallen unbrauchbar erwies. Wir haben nun den Hunden entweder eine permanente Choledochus- oder eine Gallenblasenfistel angelegt und die Galle alle 30 Minuten angesammelt, nachdem sich die Hunde von der Operation vollkommen erholt hatten. Als Narkotikum bei der Operation sollte man nicht Chloroform benutzen, weil danach die Erholung der Gallensäurensekretion sehr viele Tage beansprucht.

Dass zwischen Gallensäurensekretion und Nahrung eine enge Beziehung besteht, ist kaum zu bezweifeln; darüber wird später aus unserem Laboratorium genauer berichtet werden. Wir haben deswegen die Hunde mit einer bestimmten Nahrung ernährt, welche aus 300 g gekochtem Reis, 70 g Fisch und etwa 500 ccm japanischer Sojabohnen-Suppe bestand. Zu grosse Mengen Fleisch und Fisch haben eine sehr beträchtliche Sekretion der Gallensäuren zur Folge, aber mit dem Nachteile, dass diese während des Versuches ziemlich rasch abnehmen. Die Nahrung wurde ungefähr um 3 Uhr nachmittags verabreicht und um 8 bis 10 Uhr morgens haben wir die Versuche begonnen. Es wurde sorgfältig verhütet, dass die Hunde während der Nacht die eigene Galle ableckten.

Als Bestimmungsmethoden dienten uns für das Bilirubin die Kumekawasche Koffeinmethode, für Kochsalz die Rusznyaksche Mikromethode und für die Gallensäure die Nakagawasche rote Mikromethode.

Wir haben nicht nur die relativen Konzentrationen der Gallenbestandteile, sondern auch deren absolute Mengen, welche innerhalb je 30 Minuten sezerniert wurden, berechnet. Hieraus konnte man eine Sekretionskurve für die einzelnen Gallenbestandteile bekom-

men. Dies, glauben wir, hat wenigstens für die Gallensäurenforschung nicht unerhebliche Bedeutung; denn durch diese Versuchsmethode allein lässt sich erst eine klare Einsicht in die geringeren Sekretionsänderungen der Gallensäuren erhalten; man kann sozusagen einen Sekretionsverlauf klar einsehen, was bei den früheren Untersuchungsmethoden nur schwer zu erreichen war.

Es ist noch zu erwähnen, dass wir den Quotienten zwischen Gallensäuren und Bilirubin berechnet haben, in der Hoffnung, dadurch die Dissoziation zwischen beiden Gallenbestandteilen vor uns zu haben. Das Verhalten der Gallensäuren zum Bilirubin ist bisher nur von wenigen Forschern untersucht worden, und mit dem Ergebnisse, dass sie keine engere Beziehung zwischen beiden Substanzen finden konnten, sodass dem Quotienten keine Bedeutung zuschrieben werden konnte. Wir haben in unserem Laboratorium viel in dieser Richtung gearbeitet, mit dem interessanten Resultate, dass doch unter bestimmten Bedingungen zwischen Gallensäure und Bilirubin ein enger Zusammenhang bestehen muss. Über die diesbezüglichen Resultate wird später genau berichtet werden; hier sei nur auf die Arbeiten von Kumekawa und Gondaira hingewiesen.

III. Versuchsergebnisse.

1. Kontrollversuche.

Der richtigen Beurteilung der Versuchsresultate sollen einwandsfreie Kontrollversuche zugrunde liegen; wir mussten also zuerst sehen, ob der regelmässige Sekretionsverlauf der Gallenbestandteile durch unsere Methode zu ermitteln sei. Das ist für die Gallensäuren besonders nötig; denn es ist noch nicht klar gestellt, ob sie regelmässig in einer bestimmten Zeiteinheit sezerniert werden oder nicht.

Wenn wir nur unsere erhaltenen Resultate zusammenfassen, so hat sich herausgestellt, dass die Gallenbestandteile, das Bilirubin und die Gallensäuren unter bestimmten Bedingungen wenigstens für einige Stunden in einer bestimmten Zeiteinheit sehr regelmässig sezerniert werden, obwohl in der absoluten Menge individuelle Verschiedenheiten vorhanden sind.

Als diese Bedingungen sind zu erwähnen: erstens das Hungern während etwa 15 Stunden, zweitens eine bestimmte eiweissarme Nahrung, und drittens die Vorsicht, vor Versuchsbeginn die eigene Galle während der Nacht nicht ablecken zu lassen. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann man keine regelmässigen Sekretionskurven erwarten; die Galle wird dann unregelmässig ausgeschieden, und die Gallenbestandteile schwanken in hohem Grade. Das ist besonders der Fall für die Gallensäure; sie nimmt innerhalb weniger Stunden schnell ab. Abbildung I zeigt einen Fall, wo der Hund während der Nacht freiwillig seine eigene Galle ableckte. Man kann sehen, wie schnell die Gallensäure innerhalb kurzer Zeit abnimmt.

Als gelungene Kontrollversuche geben wir Tabelle I und II

Fig. 1.

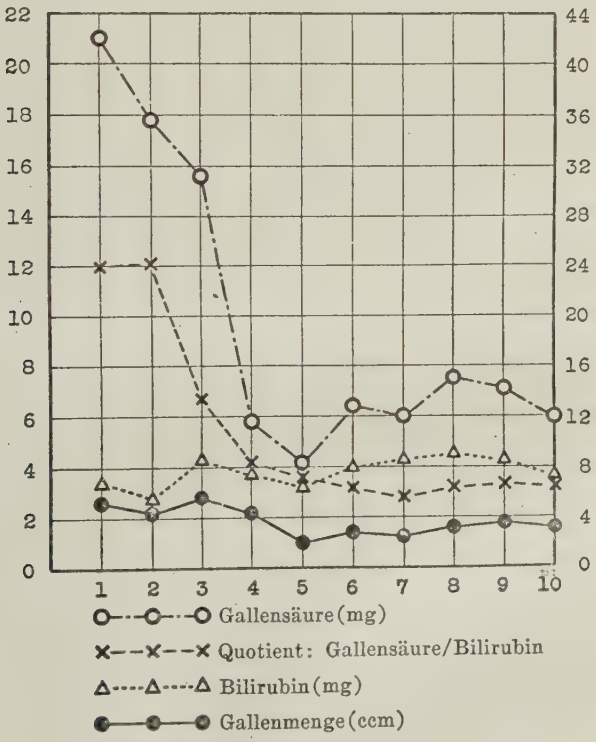


Tabelle I.
Hund Nr. 14, 12.5 kg.

Nr.	Gallenmenge (30') (ccm)	Bilirubin (B)		Gallensäure (G) (n. Raue)		G/B	Kochsalz	
		mg %	absolute Menge	mg %	absolute Menge		mg %	absolute Menge
1	2,4	88,0	2,09	666	15,0	7,6	321	7,7
2	2,0	105,0	2,10	750	15,0	7,1	328	6,6
3	1,9	107,7	2,05	750	14,3	7,0	328	6,2
4	1,7	120,0	2,04	750	12,8	6,3	328	5,9
5	1,8	118,3	2,31	750	13,5	6,3	321	5,9
6	2,0	117,3	2,35	750	15,0	6,4	328	6,5
7	2,1	112,5	2,36	750	15,0	6,6	321	6,8
8	1,8	114,1	2,11	750	13,9	6,6	321	6,1
9	2,0	115,6	2,31	750	15,0	6,6	321	6,4
10	1,9	118,8	2,27	750	14,3	6,3	328	6,2

Tabelle II.
Kontrollversuch Hund Nr. 25, 12.6 kg.

Nr.	Gallenmenge (30') (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Kochsalz	
		mg %	absolute Menge	mg %	absolute Menge		mg %	absolute Menge
1	4,8	70,9	3,4	666	32,0	9,4	479	23,0
2	4,8	70,4	3,4	666	32,0	9,5	485	23,3
3	4,7	70,9	3,4	750	35,2	10,6	479	22,5
4	4,5	71,8	3,2	750	33,8	10,4	—	—
5	4,4	72,0	3,2	750	33,0	10,4	479	21,1
6	5,0	69,3	3,5	666	33,3	9,6	496	24,8
7	4,4	74,1	3,3	833	36,6	11,2	485	21,3
8	5,3	70,8	3,7	666	35,2	9,4	473	25,0
9	4,0	77,3	3,1	750	30,0	9,7	479	19,2
10	3,8	77,3	2,9	750	28,5	9,4	473	18,0
11	5,0	77,3	3,7	750	37,5	10,2	473	23,7
12	4,5	77,3	3,1	750	33,7	10,2	473	21,3
13	4,5	70,9	3,2	750	33,7	10,6	473	21,3
14	4,0	74,1	3,3	750	33,3	10,1	479	19,2
15	4,5	70,8	3,2	666	30,0	9,4	479	21,6

Physiologische NaCl-Lösung 5 ccm intravenös injiziert.

Daraus erhellt, dass das Bilirubin und die Gallensäure in einem bestimmten Zeitabschnitt praktisch konstant sezerniert werden. Die sezernierte absolute Menge ist ganz unabhängig von der Gallenmenge. Es besteht auch eine innige Beziehung zwischen Gallensäure und Bilirubin, sodass der Quotient während der Versuche praktisch konstant bleibt.

2. Atophanversuche.

Den Hunden wurde Atophanyl (Schering) in einer Dosis von 0,3–0,7 ccm pro Kilo intravenös verabreicht.

Tabelle III.
Hund Nr. 29 ♀ 19.7 kg.

Nr.	Menge (30′) (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Kochsalz		Bemerkung
		mg%	absolute Menge	mg%	absolute Menge		mg%	absolute Menge	
1	4,5	83,1	3,74	630	28,6	7,6	555	22,6	
2	4,4	83,1	3,66	640	28,2	7,7	536	23,6	
3	3,3	104,0	3,43	860	28,4	8,3	526	22,6	
4	11,0	53,8	5,92	475	52,3	8,8	541	59,5	Atophanyl 2,5 ccm intravenös.
5	8,3	42,8	3,55	385	32,0	9,0	536	44,5	
6	5,4	62,4	3,37	560	30,2	9,0	526	23,4	
7	6,6	56,3	3,72	510	33,7	9,0	526	34,7	
8	4,8	74,8	3,57	580	27,8	7,8	507	34,3	
9	4,0	91,2	3,65	780	31,2	8,5	492	19,7	
10	4,4	84,0	3,70	735	32,3	8,7	531	23,4	
11	4,8	79,6	3,72	640	30,7	8,3	536	25,7	
12	4,4	84,0	3,70	710	31,2	8,4	526	23,1	

Aus Tabelle III und IV ergibt sich eindeutig, dass sich die Gallenmengen nach Atophaninjektion sehr auffallend vermehren; das Maximum derselben wird schon innerhalb 30 Minuten erreicht und beträgt über das Zweifache der Kontrolle. Nach 30 Minuten ist sie schon geneigt sich zu vermindern, erhält aber während 2 Stunden oder noch länger ihre Werte über die Norm. Es ist deshalb gar nicht daran zu zweifeln, das dem Atophan bei phy-

Tabelle IV.

Hund Nr. 28 ♀ 21 kg. Atophanyl 2.5 ccm intravenös.

Nr.	Menge (30′) (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		Kochsalz		G/B
		mg %	absolute Menge	mg %	absolute Menge	mg %	absolute Menge	
1	5,4	45,3	2,45	890	48,0	487	26,3	20,0
2	5,0	45,3	2,20	930	46,5	492	24,6	21,1
3	4,8	49,3	2,36	1000	48,0	492	23,6	20,3
4	10,0	36,2	2,62	605	60,5	483	48,3	19,4
5	8,9	26,9	2,39	545	48,5	502	44,7	20,3
6	8,5	28,9	2,45	570	50,7	492	42,8	20,7
7	8,6	28,9	2,48	545	46,9	497	42,9	19,0
8	8,2	31,2	2,56	580	47,6	497	40,7	18,6
9	7,9	33,2	2,62	560	44,2	507	40,0	16,8
10	6,8	38,0	2,58	650	44,2	487	33,1	17,0
11	7,0	37,4	2,62	640	44,8	502	35,1	17,1
12	6,8	37,4	2,54	650	44,2	507	34,4	17,4
13	6,9	42,2	2,91	685	47,3	507	35.0	16,2
14	6,2	43,4	2,69	650	40,3	516	32,0	15,0
15	5,0	56,2	2,81	850	42,5	502	25,1	15,1
16	5,2	53,8	2,80	820	42,6	497	25,8	25,2

siologischem Zustande der Leber eine auffallende choleretische Wirkung zuzuschreiben ist.

Die Konzentration des Bilirubins schwankt nicht unerheblich: sie wird nach der Injektion bedeutend schwächer, verhält sich aber fast umgekehrt proportional zu der Gallenmenge, mit dem Ergebnisse, dass die in 30 Minuten sezernierte absolute Menge auffallend konstant bleibt.

Die Konzentration der Gallensäure ist ebenso schwankend; je grösser die Gallenmenge ist, desto schwächer konzentriert ist der Gehalt an Gallensäure. Das hat zur Folge, dass die in einer Zeiteinheit ausgeschiedene absolute Menge während des Versuchs ganz unverändert bleibt.

Beim Kochsalz ist das Verhalten ganz anders; die Konzentration des Kochsalzes bleibt fast konstant, auch wenn sich die Gallen-

menge vermehrt. Die absolute Menge des Salzes ist also völlig abhängig von der Gallenmenge selbst.

Hier sei noch erwähnt, dass die Bilirubin- und die Gallensäuremenge, welche innerhalb der ersten 30 Minuten nach der Atophaninjektion sezerniert wird, auffallend gross ist. Daraus könnte man, oberflächlich betrachtet, eine wirkliche choleretische Wirkung auf Bilirubin und Gallensäure annehmen. Das ist aber bei genauerer Betrachtung nicht der Fall. Das Verhalten ist eher daraus zu erklären, dass die schon vor der Atophaninjektion in die Gallengänge und Kanülen sezernierte konzentrierte Galle durch den vermehrten Gallenfluss nachträglich herausbefördert wird, was natürlich zur Folge hat, dass die während der ersten 30 Minuten ausgeschiedene Menge der Gallenbestandteile viel grösser ist als vorher.

Der Quotient zwischen Gallensäure und Bilirubin verhält sich den ganzen Verlauf hindurch fast konstant. Das trifft ebenso bei vermehrter Sekretion der Galle zu. Eine Dissoziation zwischen den beiden Bestandteilen tritt daher durch Atophan nicht ein.

Wir können also zusammenfassen, dass das Atophan eine kräftige choleretische Wirkung besitzt; diese trifft aber bloss zu in bezug auf die Gallenmenge, mit anderen Worten auf die Wassermenge in der Galle; dadurch wird die sogenannte Verwässerung der Galle hervor gerufen; die spezifischen Bestandteile der Galle werden jedoch gar nicht zur vermehrten Sekretion angereizt; sie werden immer konstant sezerniert, gleichviel, ob die Galle unter der Atophanwirkung vermehrt ausgeschieden wird, oder nicht.

3. Kombinierte Versuche mit Atophan in Kombination mit Vegetativen Nervengiften.

Die Wirkungen der vegetativen Nervengifte auf die Gallensekretion werden verschieden beurteilt, aber wenn die Versuche unter den oben erwähnten Bedingungen angestellt werden, so sind sie nach unseren Erfahrungen nicht fähig, auf die Gallensekretion einen bedeutenden Einfluss auszuüben. In diesem Punkte verhält sich die Gallensekretion anders wie die der anderen Verdauungsdrüsen: der vegetativen Nervengifte üben keinen Einfluss aus oder

wirken höchstens auf die Gallenmenge allein ganz wenig vermindernd oder vermehrend ein. Hierüber werden wir in einer anderen Arbeit Näheres berichten.

Nach Brugsch und Horsters soll die Atophancholerese nicht auf dem Umweg über das Nervensystem, sondern durch direkte Einwirkung auf die Leberzellen bewirkt werden. Wir haben nun Atropinum sulfuricum, Adrenalin und Pilocarpinum hydrochloricum gleichzeitig mit, oder vor, oder nach der Atophaninjektion subcutan oder intravenös injiziert, und zwar in Dosen von 1–4 mg für Atropin und Adrenalin und 10–20 mg für Pilocarpin. Einige unserer Versuche sind in den Tabellen V–VII angegeben.

Es erhellt hieraus, dass diese vegetativen Nervengifte keinen merklichen Einfluss auf die Atophancholerese auszuüben imstande sind: die Gallenmenge und die Gallenbestandteile werden ganz unberührt ausgeschieden, genau so wie bei Darreichung von Atophan allein. Es ist deshalb der Meinung von Brugsch und

Tabelle V.

Hund Nr. 25, ♀ 13 kg. Atophanyl 4.5 ccm intravenös, gleichzeitig 0.1% Atropin 4.5 ccm subcutan.

Nr.	Menge (30′) (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Kochsalz	
		mg %	absolute Menge	mg %	absolute Menge		mg %	absolute Menge
1	2,3	52,5	1,2	1840	42,3	35,0	550	12,6
2	2,3	52,5	1,2	1840	42,3	35,0	560	12,8
3	2,0	56,2	1,1	2120	42,4	37,8	570	11,4
4	5,8	31,5	1,8	1250	72,5	39,6	560	32,5
5	5,2	21,0	1,1	780	40,5	36,9	531	27,6
6	4,5	27,3	1,2	840	37,8	30,7	531	23,9
7	4,3	32,8	1,4	890	38,2	27,1	546	23,4
8	4,2	34,0	1,4	940	38,5	27,0	551	23,1
9	3,8	34,0	1,2	910	34,8	28,9	551	20,9
10	3,2	40,4	1,2	910	29,1	23,3	561	17,9
11	3,0	46,1	1,3	1270	38,1	27,9	561	16,8
12	3,0	55,4	1,6	1100	33,0	20,0	561	16,6
13	3,1	47,7	1,6	940	29,4	20,1	580	18,0

Tabelle VI.

Hund Nr. 24, ♀ 16.2 kg. Atophanyl 3.0 ccm intravenös, gleichzeitig Adrenalin 3 ccm subcutan.

Nr.	Menge (30′) (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Kochsalz	
		mg %	absolute Menge	mg %	absolute Menge		mg %	absolute Menge
1	2,5	74,1	1,85	1460	36,5	19,7	550	13,7
2	2,5	44,5	1,86	1360	34,0	18,3	550	13,7
3	2,4	71,3	1,77	1360	32,7	19,0	546	13,1
4	8,8	31,8	2,80	630	56,2	20,2	604	53,2
5	8,2	21,3	1,73	435	36,3	20,4	614	50,3
6	7,6	22,2	1,69	420	32,0	18,9	614	46,6
7	7,1	26,2	1,87	475	32,7	17,5	604	42,8
8	7,0	30,9	2,13	475	33,4	15,5	604	42,2
9	6,4	29,9	1,91	500	32,0	16,8	600	37,1
10	4,9	35,5	1,74	694	34,0	19,6	600	29,4
11	4,0	52,3	2,09	937	37,5	17,9	580	24,4
12	3,0	55,0	1,65	984	29,5	17,9	575	18,1
13	3,0	66,7	2,00	1230	36,9	18,5	575	18,1
14	3,0	57,7	1,73	1240	37,2	18,2	575	18,1

Horsters zuzustimmen, dass das Atophan unabhängig vom Nervensystem direkt auf die Leberzellen einwirkt.

IV. Schlussfolgerung.

1. Bei Choledochus- oder Gallenblasenfistelhunden ist die Sekretion der spezifischen Gallenbestandteile (Bilirubin und Gallensäure) unter bestimmten Versuchsbedingungen auffallend regelmässig. Obwohl die Gallensekretion geneigt ist, während einiger Stunden an Menge allmählich abzunehmen, bleibt die absolute Menge des Bilirubins und der Gallensäuren, welche innerhalb je 30 Minuten sezerniert werden, auf konstanter Höhe. Wenn die Versuchsdauer noch länger gewählt wird, so nimmt die Gallensäure langsam und sehr wenig ab. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration des Kochsalzes in der Galle sehr konstant; deswegen hängt seine absolute Menge in gegebener Zeiteinheit von der Gallenmenge

Tabelle VII.

Hund Nr. 32, ♀ 18 kg. Atophanyl 4 ccm, 1% Pilocarpin 1 ccm gleichzeitig intrav.

Nr.	Galle (30') (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Kochsalz	
		mg %	abs. M. (mg)	mg %	abs. M. (mg)		mg %	abs. M. (mg)
1	1,5	119,4	1,8	1800	27,0	15,0	604	9,1
2	1,5	119,4	1,8	1800	27,0	15,0	609	9,1
3	1,5	122,1	1,8	1850	27,7	15,1	604	9,1
4	7,0	50,0	3,5	700	49,0	14,0	624	43,8
5	6,5	36,4	2,3	425	27,6	12,0	624	40,6
6	6,0	42,8	2,5	510	30,6	12,0	634	38,0
7	5,6	39,8	2,2	490	27,4	12,2	643	36,0
8	5,6	39,8	2,2	500	28,0	12,5	628	34,9
9	4,6	39,8	1,8	545	25,1	13,7	619	28,5
10	4,6	37,4	1,7	570	26,2	15,1	643	29,6
11	4,0	45,0	1,8	535	21,4	11,9	638	25,3
12	5,3	—	—	535	28,4	—	—	—
13	3,6	53,0	1,9	665	23,9	12,0	634	22,8
14	3,3	63,2	2,1	780	25,7	12,3	648	21,4
15	3,9	58,6	2,2	760	29,6	13,0	673	20,3
16	2,9	66,4	1,9	855	24,8	12,8	634	18,4
17	2,6	80,8	2,1	1027	26,7	12,7	653	17,0

ab. Die Quotienten zwischen Gallensäuren und Bilirubin bleiben selbstverständlich einige Stunden hindurch fast konstant.

2. Die hier in Frage kommenden Bedingungen bestehen darin, erstens dass der Hund mit einer bestimmten eiweissarmen Nahrung ernährt wird, zweitens dass man den Hund etwa 15 Stunden hungern lässt, und drittens dass das Ablecken der eigenen Galle während der Nacht vor dem Versuchstage streng verhütet werden muss. Es ist kaum nötig hier hervorzuheben, dass man irgendeine Stauung in den Gallenwegen vollkommen beseitigen muss; auch die geringgradigste Stauung hat schon einen bedeutenden Einfluss auf die Gallensäuren.

3. Atophan, in Form von Atophanyl intravenös verabreicht, ruft eine bedeutende Cholerese hervor entsprechend den Angaben

von Brugsch und Horsters; die Gallenmenge erreicht ihr Maximum schon in den ersten 30 Minuten, nimmt dann allmählich ab, wird jedoch noch einige weitere Stunden hindurch vermehrt gefunden.

Das Bilirubin und die Gallensäuren werden aber konstant sezerniert und sind ganz unabhängig von der Gallenmenge. Höhere Werte in den ersten 30 Minuten sind daraus zu erklären, dass die schon in die Gallenwege sezernierte konzentrierte Galle durch vis a tergo herausbefördert wird. Die Angabe von Brugsch und Horsters, dass die Gallensäuren unter Einfluss von Atophan vermehrt sezerniert werden, ist als unrichtig bewiesen. Der Fehlschluss von Brugsch und Horsters hat wahrscheinlich seinen Grund darin, dass die Autoren durch die Messung der Oberflächenspannung den Gallensäurengehalt in der Galle bestimmten.

4. Die Atophancholerese wird durch die vegetativen Nervengifte gar nicht behindert. Es ist deswegen, wie Brugsch und Horsters angegeben haben, anzunehmen, dass die Atophancholerese durch direkte Reizwirkung auf die Leberzellen hervorgerufen wird.

5. Die Atophancholerese besteht bloss in der Vermehrung der Gallenmenge; die spezifischen Bestandteile der Galle (Bilirubin und Gallensäuren) werden nicht in vermehrtem Masse ausgeschieden. Es kommt auch keine Dissoziation zwischen beiden Substanzen durch Atophan zustande. Wie dies sich aber bei den pathologischen Zuständen der Leber verhalten wird, muss vorerst dahingestellt bleiben. Es ist noch eine Frage, ob die Verwässerung der Galle als ein Zeichen der Giftwirkung des Atophans angesehen werden muss, wie es Stransky betonte.

LITERATUR.

Brugsch und Horsters: Zs. f. ges. exp. Med., 38, 376, 1923; Ebenda, 43, 517 und 716. 1924.

Foster and Hooper (1919): J. of biolog. chem., 38, 355.

Gondaira (1929): Tuberculosis (japanisch), 7, 414.

Kumekawa (1926): Zs der Tokyo mediz. Gesellschaft (japanisch) 40, 805.

Kumekawa (1927): Ebenda., 42, 123.

Nakagawa und Fujikawa (1930): diese Zs., **12**, 399.
Nakagawa und Yoshikawa (1931): diese Zs., **13**, 321.
Raue (1926): Zs. f. klin. Med., **102**, 79.
Sakamoto und Fujikawa (1931): diese Zs., **13**, 309.
Stransky (1925): Biochem. Zs., 155.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

STUDIEN ÜBER DEN GALLENSÄURENSTOFFWECHSEL.

(Begonnen und geleitet von S. Nakagawa.)

VI. Über die Beziehung zwischen Gallensäurensekretion und Blockierung des Retikuloendothelialen Systems.

Von

HISASHI MIKAMI.

(*Aus der medizinischen Klinik der Kaiserlichen Universität zu Sapporo. Vorstand: Prof. Dr. S. Nakagawa.*)

(Eingegangen am 30. September 1931)

I. Einleitung.

Die früheren Untersuchungen über die Gallensekretion der Leber bezogen sich meistens bloss auf die sezernierten Gallenmengen oder wenn etwas ganauer untersucht wurde, ausser auf die Gallenmenge noch auf die Mengen des Bilirubins und der anorganischen Bestandteile. Erst seitdem Foster und Hooper (1919) ihre gasometrische Methode veröffentlicht hatten, ist die Physiologie und Pathologie der Gallensäurensekretion ziemlich klargestellt worden. Die Methode ist zweifellos zur Zeit als die idealste für die gekuppelten Gallensäuren anzusehen, ergibt aber mit einer geringen Menge Ausgangsmaterial nicht immer sichere Resultate, weswegen man genötigt ist, die Versuchsdauer auf lange Zeit auszudehnen. Seitdem dann Nakagawa und Fujikawa (1930) eine neue kolorimetrische quantitative Bestimmungsmethode für Gallensäuren ausgearbeitet haben, ist die Erforschung des Gallensäurenstoffwechsels wesentlich vereinfacht worden.

Die Gallensäuren gelten als ein spezifischer Bestandteil der Galle und werden, wie zur Zeit im allgemeinen angenommen, nur in der Leber produziert, um in die Gallen ausgeschieden zu werden. Aber wo wird nun die Gallensäure in der Leber gebildet? Dass die Leberzellen selbst hierbei die Hauptrolle spielen werden, kann

aus klinischen und experimentellen Ergebnissen als sicher angenommen werden; die genauen klinischen und experimentellen Untersuchungen von Fujikawa in unserem Laboratorium haben diese Ansicht bestätigt, worüber später genau berichtet werden wird. Ob die Sternzellen aber, welchen zur Zeit sehr viele wichtige Funktionen zugeschrieben werden, bei der Gallensäurensekretion irgendeine Rolle spielen, darüber findet man nur wenige Literaturangaben.

1924 hat Elek in einer Arbeit dieses Problem nur kurz berührt: er hat nämlich Hunden zum Zwecke der Blockierung des Reticuloendothelialsystems 10–60 ccm von 33%igem Ferrum oxydatum sacharatum einige Tage hindurch intravenös injiziert, mit dem Ergebnisse, dass das Bilirubin in der Galle dadurch beinahe bis zu Null heruntersank, während die Gallensäuren (Foster und Hoopersche Methode) bald unverändert, bald vermindert sezerniert wurden. Er hat sich deswegen einen entscheidenden Schluss vorbehalten, ob zwischen Sternzellen und Gallensäurensekretion irgendeine Beziehung besteht,

1927 hat Yonemura versucht, ganz unabhängig von Elek, die Beziehung zwischen Gallensäurensekretion und Blockade des Retikuloendothelialsystems zu erforschen. Er hat dabei an Gallenblasenfistelhunden bei bestimmter Nahrung, und zwar ohne die Tiere ihre eigenen Gallen ablecken zu lassen, die Gallensäuren während 6 Stunden mittels der Foster-Hooperschen Methode bestimmt. Zum Zwecke der Blockierung wurden 13,5–80 ccm Tusche-Lösung intravenös verabreicht. Durch seine Versuche ist er zum Ergebnisse gekommen, dass die Gallensäuren unter dem Einfluss der Blockierung merkwürdig vermindert sezerniert werden, dass diese verminderte Sekretion aber nicht länger als 24 Stunden überdauert. Yonemura hat hieraus geschlossen, dass das retikuloendotheliale System bei der Gallensäurenbildung eine wichtige Rolle spielen muss.

Wenn wir nun die bisherigen Untersuchungsmethoden übersehen, so bestehen sie darin, dass man mehrere Tage hintereinander manchmal sehr grosse Mengen von Blockierungsmitteln intravenös injizierte und die Menge der Gallensäurensekretion während einiger

Tage mit einander verglich. Diese Methode ist wahrscheinlich nicht die idealste; denn die Gallensäurensekretion ist durch die Nahrung und andere Bedingungen leicht zu beeinflussen, wodurch eine genaue Vergleichung schwer durchzuführen ist.

Wir beabsichtigten deswegen, eine klarere Einsicht in die Gallensäurensekretion bei der Blockierung zu erhalten, indem wir die Versuchsdauer kürzer wählten, und zwar unter Anstellung von Serienversuchen, wie sie Sakamoto in unserem Laboratorium bei Atophan-Cholerese gemacht hatte.

II. Versuchstechnik.

Als Blockierungsmittel dienten uns Tusche, Elektralgol und Farbstoffe, wie Lithioncarmin.

Als Versuchstiere haben wir ausschliesslich Hunde benutzt, denen eine komplette Gallenblasenfistel angelegt wurde. Nach der Operation liessen wir die Hunde beliebig die eigene Galle ablecken, um sie sich möglichst schnell erholen zu lassen. Bevor wir die Hunde zum Versuch gebrauchten, haben wir sie mit einer bestimmten Nahrung ernährt, welche aus 400 g gekochtem Reis, 100 g Fisch und 500 ccm Soja-Bohnen-Suppe bestand; es ist ja schon bekannt, dass die Gallensäurensekretion von der Nahrung äusserst abhängig ist. Es ist ferner unbedingt notwendig, die Tiere vor dem Versuchsbeginn etwa 15 Stunden vollkommen hungern zu lassen und ausserdem die Ableckung der eigenen Galle zu verhindern, wie Sakamoto in unserem Laboratorium betont hatte; sonst gestaltet sich die Gallensäurensekretion sehr unregelmässig, wodurch die richtige Beurteilung der Versuchsresultate sehr schwer wird. Die Gallen haben wir alle 30 Minuten durch eine tief eingeschobene Gummikanüle angesammelt und einzeln analysiert.

Die Gallensäuren wurden nach der Nakagawa-Fujikawaschon roten Methode bestimmt, und obschon die Gallensäuren der Hundegalle hauptsächlich Taurocholsäure sind, der Bequemlichkeit halber als glykocholsaures Natrium in den Tabellen angegeben. Das Bilirubin wurde nach der Kumekawaschen Koffein-Methode, und das Kochsalz nach Rusznyak quantitativ ermittelt. Wir

haben ausserdem noch die Quotienten zwischen Gallensäuren und Bilirubin berechnet, um die Dissoziation zwischen beiden Hauptbestandteilen zu erkennen.

III. Versuchsergebnisse.

A. Kontrollversuche.

Weil wir, wie oben erwähnt, die Versuchsdauer auf einige Stunden beschränkten, so mussten wir erst genaue Kontrollversuche ausführen, um zu sehen, ob die Galle, und besonders das Bilirubin und die Gallensäure, während dieser Zeit regelmässig ausgeschieden werden. Wenn dies nicht der Fall wäre, so würde eine richtige Beurteilung der Versuchsresultate äusserst schwierig sein. Die hierzu notwendigen Kontrollversuche hatte Sakamoto in unserem Laboratorium genau ausgeführt und beschrieben, mit dem Ergebnisse, dass wenigstens das Bilirubin und die Gallensäure, welche innerhalb einer Zeiteinheit (30 Minuten) ausgeschieden werden, unabhängig von der Gallenmenge praktisch konstant bleiben, wenn die oben beschriebenen Versuchsbedingungen und die Vorbereitung der Hunde lückenlos erfüllt werden; die Gallensäure jedoch zeigt eine Neigung, innerhalb einiger Stunden ganz langsam abzusinken, jedoch ohne dadurch die Beurteilung der Versuchsresultate zu beeinträchtigen. Wir haben auch selber oftmals Versuche daraufhin angestellt und konnten die Angaben von Sakamoto vollkommen bestätigen; deswegen werden wir wegen der Raumersparnis darauf verzichten, die Resultate der Kontrollversuche widerzugeben. Es sei nur darauf hingewiesen, dass die Sekretionskurven des Bilirubins und der Gallensäure fast eine gerade Linie darstellen, und dass die Quotienten der beiden Substanzen fast konstant bleiben oder wegen der langsamen Verminderung der Gallensäure nur wenig und allmählich absinken.

B. Blockierung mit Tusche.

Tusche-Lösungen werden zur Blockierung des retikuloendothelialen Systems gern benutzt. Wir haben als solche eine in hiesigem Lande im Handel erhältliche Tusche-Stammlösung

(„Kaimei-bokuju") in Anwendung genommen. Dem seit dem Vortage zum Versuche vorbehandelten Hunde wurde die Tusche-Lösung morgens früh intravenös injiziert, nachdem der glatte Gallenfluss bestätigt worden war. Tabelle I zeigt einen Fall, wo grössere Mengen von Tusche in kurzen Intervallen hintereinander verabreicht wurden.

Tabelle I.

Hund ♀ 15 kg,

Nr.	Zeit (Std)	Galle (ccm)	Bilirubin (B)		Gallensäure (G)		G/B	Bemerkungen
			mg %	abs. M. (mg)	mg %	abs. M. (mg)		
1	3,5	4,0	60,0	2,4	1180	47,2	19,7	
2	3,0	4,0	60,0	2,4	1180	47,2	19,7	
3	2,5	5,2	50'0	2,6	850	44,2	17,0	← Tusche 7,5 ccm intraven.
4	2,0	4,4	112,0	2,7	1500	36,0	13,4	
5	1,5	2,0	17,0	2,3	1500	30,0	12,8	← T. 5,0 ccm
6	1,0	2,0	109,3	2,2	1350	27.0	13,3	
7	0,5	2,0	84,0	1,7	1020	20,4	12,0	
8	0,5	1,4	99,0	1,4	990	13 9	10,0	← T. 7,5 ccm
9	1,0	1,1	126,0	1,4	1050	11,5	8,3	
10	1,5	1,0	126,0	1,3	900	9,0	7,2	
11	2,0	1,0	108,0	1.1	760	7,6	7.0	
12	2,5	1,1	99,0	1,1	700	7.7	7,1	
13	3,0	1,2	93,3	1,1	700	8,4	7,5	
14	3,5	1,3	96,0	1,2	670	8,7	7,0	
15	4,0	1,5	100,2	1,5	770	10,5	7,7	
16	4,5	1,4	120,0	1,7	850	11,9	7,1	
17	5,0	1,5	120,0	1,8	920	13,8	7,7	
18	5,5	1,8	103,8	1,9	970	17,5	8,4	
19	6,0	1,8	108,0	1,9	1000	18,0	9,2	
20	6,5	1,9	102,0	1,9	1000	19.0	9,5	

Es ist leicht ersichtlich, dass die Gallenmenge durch Tusche-Injektion zunächst abzunehmen geneigt ist, um sich dann allmählich

wieder zu vermehren. Das Bilirubin wird bei der verminderten Gallenmenge in höherer Konzentration ausgeschieden, aber wenn man die in einer Zeiteinheit sezernierte absolute Menge betrachtet, so nimmt sie bedeutend ab, bis unter die Hälfte der Menge vor der Injektion, und vermehrt sich dann wieder allmählich, um nachher zur Norm zurückzukehren.

Was die Gallensäurensekretion anbelangt, so nimmt die Konzentration derselben deutlich ab, und auch die absolute Menge zeigt eine erhebliche Verminderung; das Minimum beträgt bloss einen Bruchteil der Anfangswerte. Diese Verminderung des Bilirubins und der Gallensäuren hat die Neigung, nach einigen Stunden wieder zur Norm zurückzukehren, aber 6,5 Stunden nach der letzten Injektion kann man noch die verminderten Werte feststellen. Wenn man die Quotienten zwischen Gallensäure und Bilirubin auf dieses Verhalten hin betrachtet, so treten die Veränderungen des Sekretionsverlaufes noch klarer in Erscheinung. Die Quotienten sinken nämlich direkt nach der Tusche-Injektion herab, um dann im späteren Stadium des Versuchs wieder anzusteigen. Hieraus ergibt sich, dass das Bilirubin und die Gallensäure nicht gleichmässig der verminderten Sekretion unterworfen werden, sondern dass die Gallensäurensekretion durch Tusche-Injektion viel bedeutender beeinträchtigt wird, und ausserdem dass die Wiederherstellung der Gallensäurensekretion viel langsamer eintritt als die des Bilirubins.

Dasselbe Verhalten haben wir auch dann gefunden, wenn die Tusche-Lösung nur einmal injiziert wurde. Hier sei ein solcher Fall angegeben (Tabelle II). In diesem Falle wurde die Stammlösung von Tusche auf das 5-fache verdünnt und durch Faltenfilter filtriert. Obwohl von der filtrierten Lösung 30 ccm injiziert wurden, so war die Menge der Tusche-Partikelchen im Vergleich zum vorigen Versuche auffallend gering.

In diesem Falle zeigte das Bilirubin bei der ersten Injektion keine verminderte Sekretion, obwohl die Gallensäure bedeutend abnahm. Der Quotient stieg ab. Nach 24 Stunden erholte sich die Gallensäuresekretion merklich, und nach 43 Stunden, wo das Bilirubin und die Gallensäure genau die Anfangswerte erreicht

hatten, wurde zum zweiten Male Tusche injiziert. Diesmal konnten wir bestätigen, dass das Bilirubin und die Gallensäure bedeutend abnahmen, und zwar die letztere in höherem Grade.

Wenn die Tuschemenge noch geringer gewählt wurde, so wurden die erwähnten Befunde immer undeutlicher. Hieraus und aus der Tatsache, dass an den Hunden nach der Injektion keine merklichen somatischen und psychischen Veränderungen wahrgenommen wurden, dürfte man schliessen können, dass die Veränderungen, besonders in der Sekretion der Gallensäure, in der Tat auf der Blockade des retikuloendothelialen Systems beruhen.

C. Blockierung mit Elektralgol.

Elektralgol wird ebenfalls gern zu Blockierungsversuchen gebraucht. Wir haben es deswegen wie Tusche intravenös injiziert und zwar gemischt mit Kochsalzlösung. Tabelle III stellt einen Fall dar, wo Elektralgol in relativ grösserer Menge mehrmals in kurzen Abständen injiziert wurde. Die Gallenmenge nimmt nach der Injektion eher etwas zu und erst eine Stunde nach der letzten Injektion langsam ab. Das Bilirubin vermehrt sich im Gegensatz zu dem Verhalten bei der Tusche-Injektion, um nach einigen Stunden wieder zu Norm zurückzukehren. Was die Gallensäure anbelangt, so wird sie in verminderten Masse sezerniert wie bei Tusche-Injektion und zeigt keine Neigung nach einigen Stunden zur Norm zurückzukehren.

Dasselbe Verhalten haben wir bei einmaliger Injektion einer kleineren Dosis auch bestätigen können. (Tabelle IV) Wenn man jedoch in noch kleinerer Dosis injizierte, so traten die Veränderungen der Gallensekretion, insbesondere der Gallensäuresekretion, in geringerem Masse auf, und man kann da klarer sehen, in welcher Weise die Gallensekretion, besonders die Gallensäuresekretion, zur Norm zurückkehrt (Tabelle V).

Kurz zusammengefasst, wird die Gallensäure durch die Elektragolinjektion auffallend vermindert sezerniert wie bei Tusche, aber das Biliburin zeigt im Gegensatz zu Tusche-Behandlung eine vermehrte Ausscheidung. Die Quotienten nehmen deswegen immer mehr ab.

Tabelle II.

Hund ♀ 12 kg.

Nr.	Zeit (Std)	Galle (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Kochsalz		Bemerkung
			mg %	Abs. Menge (mg)	mg %	Abs. Menge (mg)		mg %	Abs. Menge	
1	1,5	3,3	107,7	3,6	1480	48,8	13,7	619	20,4	
2	1,0	3,4	112,5	3,8	1480	50,3	13,1	619	21,0	
3	0,5	3,7	109,3	4,0	1480	54,7	13,5	619	23,0	
4	0,5	5,0	86,0	4,3	975	40,8	11,3	599	29,9	← Tusche 5× verdünnt, filtriert. 30 ccm i. v.
5	1,0	4,2	84,9	3,5	960	40,3	11,3	599	25,1	
6	1,5	3,8	93,6	3,6	938	35,6	10,0	604	22,9	
7	2,0	3,5	96,0	3,2	900	31,5	9,4	604	21,1	
8	2,5	3,5	98,4	3,4	900	31,5	9,0	609	21,1	
9	3,0	3,5	106,6	3,7	870	30,5	8,2	614	21,4	
10	3,5	3,1	107,7	3,3	795	24,6	7,4	614	19,0	
11	4,0	3,0	112,5	3,4	637	19,1	5,6	619	18,4	
12	4,5	3,2	112,5	3,6	640	20,5	5,7	619	19,8	
13	6,0	3,1	112,5	3,5	580	20,0	5,2	619	19,2	
14	5,5	3,2	107,7	3,4	490	15,7	4,5	616	19,8	
15	6,0	3,2	107,7	3,4	460	14,7	4,3	619	19,8	

					Vom nächsten Morgen an.					
16	0,5	3,8	106,7	4,0	1035	39,8	9,7	614	23,3	
17	1,0	4,0	106,7	4,2	1020	40,8	9,5	614	24,5	
					Vom übernächsten Morgen an.					
18	1,0	4,4	81,2	3,5	1200	52,8	14,7	624	27,4	
19	0,5	4,4	81,2	3,5	1200	52,8	14,7	624	27,4	
20	0,5	4,5	57,8	2,6	720	32,4	12,4	711	32,0	← Tusche ditto
21	1.0	4,2	61.6	2,6	725	30,6	11,7	648	27,2	
22	1,5	4,2	58,6	2,4	710	29,8	12,1	638	26,7	
23	2,0	3,2	58,6	1,9	700	22,4	11,9	643	20,5	
24	2,5	3,2	64,0	2,0	575	21,6	10,5	643	20,5	
25	3,0	2,8	65,6	1,8	575	16,1	8,7	638	17,8	
26	3,5	2,1	75,6	1,6	545	11,4	7,2	633	13,3	
27	4,0	2.1	80,0	1,7	488	10,1	6,0	633	13,3	
28	4,5	2,0	80,0	1,6	453	9,0	6,8	633	12,6	
29	5,0	2,0	72,8	1,4	447	8,9	6,1	633	12,6	
30	5,5	2,0	60,2	1,2	345	6,9	6,7	633	12,6	

Tabelle III.
Hund ♀ 20 kg.

Nr.	Galle (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkung
		mg %	abs. M. (mg)	mg %	abs. M. (mg)		
1	2,9	58,6	1,7	1800	52,2	32,4	
2	3,0	58,3	1,8	1680	50,4	28,8	
3	3,0	58,6	1,7	1785	53,6	30,4	
4	3,7	37,3	1,4	1605	59,9	43,0	← Elektralgol
5	3,7	64,0	2,4	1605	59,3	25,0	10 ccm i. v.
6	4,0	88,0	3,5	1200	48,0	13,6	← ditto 5 ccm
7	4,6	93,3	4,2	1050	48,8	11,2	
8	4,2	88,0	3,6	930	39,0	10,5	← ditto 5 ccm
9	3,8	96,0	3,6	980	37,2	10,2	
10	3,8	104,0	3,9	1065	40,4	10,2	← ditto 5 ccm
11	3,3	106,6	3,5	1125	37,1	10,4	
12	2,6	112,0	2,9	1125	26,1	10,0	
13	2,4	115,7	2,7	1120	24,3	9,8	
14	2,2	115,7	2,5	1155	25,4	9,8	
15	2,2	96,0	2,1	1125	24,1	11,6	
16	2,1	91,7	1,9	1125	23,6	12,2	
17	2,2	88,0	1,9	1140	25,0	12,8	†
18	2,1	96,0	2,0	1155	24,2	11,2	

Tabelle IV.
Hund ♂ 16 kg.

Nr.	Galle (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkung
		mg %	abs. M. (mg)	mg %	abs. M. (mg)		
1	5,7	31,2	1,8	1160	66,1	37,2	
2	4,3	31,2	1,4	1160	49,3	25,7	← Elektralgol
3	4,7	45,0	2,1	1160	54,5	13,8	4.8 ccm i. v.
4	4,3	82,4	3,5	1140	49,0	10,2	
5	5,0	86,8	4,3	890	44,5	9,8	
6	4,3	86,8	3,7	855	36,9	10,3	
7	4,1	82,4	3,4	852	34,9	10,3	
8	4,1	81,6	3,3	840	34,4	9,9	
9	3,0	82,0	2,5	810	24,3	9,7	
10	2.9	78,9	2,3	768	22,3	10,1	
11	3,3	75,6	2,6	758	25,3	10,3	
12	3,3	72,8	2,4	750	24,5	10,3	
13	3,3	72,8	2,4	750	24,5	10,5	
14	2,8	71,2	1,9	750	21,9		
15	2,3	70,3	1,6	768	17,6	10,9	
16	2,4	69,2	1,6	768	18,4	11,1	
17	2,4	69,2	1,7	768	18,4	11,1	

Tabelle V.

Hund ♀ 20 kg. Electralgol 1 ccm intravenös.

Nr.	Galle	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Kochsalz	
		mg %	abs. M.	mg %	abs. M.		mg %	abs. M.
1	2,6	11,88	3,2	1115	29,0	9,3	516	13,4
2	2,7	11,88	3,3	1115	29,0	9,3	516	13,9
3	3,6	100,8	4,0	1020	36,7	9,2	507	18,2
4	2,8	115,6	3,2	950	26,6	8,2	502	14,0
5	2,8	160,0	4,5	950	26,6	5,9	492	9,5
6	2,6	157,9	4,1	930	24,9	6,1	492	12,8
7	2,3	174,6	4,0	998	22,9	5,7	482	11,1
8	2,4	168,7	4,0	998	23,9	5,9	477	11,4
9	2,5	162,0	3,7	998	22,9	6,1	458	10,5
10	2,5	150,0	3,7	998	24,4	6,5	472	11,8
11	2,2	173,5	3,8	1160	2,55	6,6	482	10,6
12	2,0	181,2	3,6	1230	24,6	6,8	492	9,8
13	2,0	171,1	3,4	1260	25,2	7,3	492	9,8
14	2,1	171,1	3,6	1370	28,8	8,0	497	10,4
15	2,2	165,5	3,6	1370	30,1	8,2	502	11,0
16	1,4	234,0	3,3	2060	28,8	8,8	511	7,1
17	2,0	168,7	3,4	1470	29,4	8,7	516	10,3

D. Blockierung mit Lithioncarmin.

Lithioncarmin ist als Vitalfärbungsmittel wohl bekannt; es wird nach Angabe von Kiyono von den Sternzellen gierig, von den eigentlichen Leberzellen nur ganz spärlich gespeichert. Wir gingen nun darauf aus zu sehen, wie sich die Gallensäurensekretion bei Carmininjektion verhalte; es schien uns von Interesse zu sein, ob sie anders als Tusche oder Elektralgol einwirken könne.

Carmin (Grübler) wurde als 4%ige Lösung in gesättigter Lithiumcarbonatlösung aufgelöst, durch Filtrierpapier filtriert und

Tabelle VI.

Hund ♀ 30 kg. 4% Lithioncarmin 5 ccm intrav.

Nr.	Galle	Bilirubin		Gallensäure		G/B
		mg %	abs. M.	mg %	abs. M.	
1	3,2	112,0	3,6	1680	53,8	15,0
2	3,2	112,0	3,6	1680	53,8	15,0
3	2,8	140,0	3,9	1740	58,7	12,4
4	2,7	146,6	3,9	1995	57,8	12,3
5	3,0	150,0	4,5	1800	54,0	12,0
6	3,0	113,3	3,6	1350	43,2	11,9
7	2,2	146,6	3,2	1680	37,0	11,4
8	2,0	197,2	3,9	1965	39,3	10,0
9	2,3	183,3	4,2	1740	39,6	9,4
10	1,5	201,0	3,0	1845	27,7	9,2
11	1,7	242,3	4,1	1635	27,8	7,0
12	1,7	198,0	3,4	1600	28,6	8,1
13	2,2	167,2	3,7	1200	26,4	7,2
14	1,5	200,0	3,0	1500	22,5	7,4
15	2,1	197,3	4,1	1600	31,5	7,6

Tabelle VII.

Hund ♀ 20 kg. 4% Lithioncarmin 2 ccm intrav.

Nr.	Galle	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Kochsalz	
		mg %	abs. M.	mg %	abs. M.		mg %	abs. M.
1	3,1	79,2	2,4	1380	42,7	17,4	516	16,0
2	3,6	66,4	2,4	1210	43,5	19,7	521	18,7
3	4,3	57,9	3,3	1050	45,3	18,1	530	23,0
4	3,8	93,2	2,4	1160	44,0	18,3	516	19,6
5	4,1	67,2	2,3	1020	41,8	17,8	621	21,3
6	3,4	72,0	2,4	960	32,6	13,3	526	17,9
7	4,1	57,2	2,3	700	28,7	12,2	526	21,5
8	4,0	58,0	2,3	725	29,0	12,5	526	21,0
9	4,0	60,0	2,4	697	27,9	11,6	516	20,6
10	4,0	68,0	2,7	682	27,3	10,0	521	20,8
11	4,8	60,0	2,7	677	27,7	9,6	636	25,7
12	—	—	—	—	—	—	—	—
13	3,3	104,0	3,4	817	26,9	7,8	511	16,8
14	3,6	87,2	3,1	780	27,8	9,0	516	18,5
15	3,4	87,2	2,8	840	28,5	9,9	511	17,4
16	3,2	88,0	2,9	860	27,5	9,8	497	15,9
17	2,6	96,0	2,5	1240	32,2	12,9	468	12,1
18	2,7	91,7	2,5	1440	37,4	17,7	463	12,5
19	2,6	93,3	2,4	1500	39,0	16,0	463	12,0

Tabelle VIII.

Hund ♀ 20 kg. Gesättigte Lithiumcarbonatlösung 2 ccm inträvenös.

Nr.	Galle	Bilirubin		Gallensäure		G|B
		mg %	abs. M.	mg %	abs. M.	
1	4,1	96,9	3,1	970	39,8	11,1
2	3,9	88,0	3,2	1010	39,4	11,4
3	4,1	66,8	3,1	970	39,8	11,1
4	4,2	84,0	3,5	970	40,7	11,5
5	3,9	90,0	3,5	970	37,8	10,7
6	3,7	90,0	3,3	940	34,8	10,4
7	3,3	99,9	3,3	1040	34,3	10,4
8	3,7	90,0	3,3	1020	37,7	11,3
9	4,4	75,9	3,3	920	40,4	12,1
10	3,9	81,9	3,2	1010	39,4	12,3
11	—	98,4	—	1090	—	11,1
12	2,9	143,0	4,1	1590	46,1	11,1
13	2,7	141,1	3,1	1500	40,5	13,1
14	2,3	142,6	3,3	1800	41,4	12,6
15	2,0	159,0	3,1	1860	37,2	11,9
16	2,1	156,0	3,2	1860	39,1	11,9

nach der Sterilisation injiziert. Die Resultate sind in Tabelle VI und VII angegeben.

Es zeigt sich, dass das Bilirubin keiner merklichen Veränderung unterliegt, während die Gallensäure deutlich abnimmt. Dass dem Lithiumcarbonat als Lösungsmittel hierbei keine Bedeutung zuzuschreiben ist, ist aus Tabelle VIII leicht ersichtlich, wo die Lithiumcarbonatlösung allein injiziert wurde.

E. Versuche mit Kongorot.

Adler und Reimann (1925) haben eine Methode für die Funktionsprüfung des Retikuloendothelialsystems veröffentlicht,

welche darin besteht, dass man Kongorotlösung intravenös injiziert und nach bestimmten Zeiten den Rest des Farbstoffes im Serum kolorimetrisch misst. Dieser Farbstoff wird, wie bekannt, intravenös injiziert von den Sternzellen und dem Retikuloendothelialsystem aufgefangen und in die Galle ausgeschieden. Gegen diese Prüfungsmethode wandte sich neuerdings Takeda; nach ihm soll Kongorot, in kleinerer Dosis injiziert, von den Sternzellen aufgespeichert und dann in die Galle ausgeschieden werden; bei Injektion einer grösseren Menge werde es aber von den Retikuloendothelien überhaupt aufgefangen. Deswegen dürfe die Methode nicht als Prüfungsmethode für das allgemeine Retikuloendothelialsystem gelten; ausserdem sei noch unklar, welche Rolle die Leberzellen und die Sternzellen untereinander spielen werden. Trotz dieser Einwände ist doch klar, dass das Kongorot in die Galle ausgeschieden wird. Deswegen haben wir hier mit Kongorot untersucht, wie sich bei der Ausscheidung des Kongorotes die Gallensäurensekretion verhält.

Kongorot wurde als 1% ige wässerige Lösung sterilisiert und in die Vene eingespritzt. Das Bilirubin war nicht zu bestimmen; die Farbennuance des Kongorotes in der Galle wurde nach Augenmass in die Tabellen eingefügt. (Tabelle IX und X).

Aus diesen Tabellen zeigt sich, dass die Gallenmenge nicht merklich zunimmt, aber ihre natürliche Verminderung sehr verspätet einzutreten scheint. Die Gallensäure wird bei der Verabreichung grösserer Mengen von Kongorot, wo der Farbstoff intensiv in die Galle ausgeschieden wird, auffallend vermindert sezerniert, ist aber bei einer kleinen Menge von Kongorot kaum der Verminderung unterworfen, sondern wird in fast konstanter Höhe ausgeschieden. Kurz zusammengefasst, ist das Verhalten der Gallensäurensekretion ganz ähnlich wie bei der Blockierung mit anderen Mitteln.

F. Einfluss der Blockierung auf die Elimination der intravenös verabreichten Gallensäuren.

Sakamoto hat in unserem Laboratorium sehr klar bewiesen, dass wenn dem Hunde ca. 250 mg Gallensäure intravenös ver-

Tabelle IX.

Hund 21 kg. 1% Kongorotlösung 21 ccm intraven.

Nr.	Zeit (Std)	Galle	Gallensäure		Kongorot in d. Galle
			mg %	abs. Menge.	
1	0,0	4,0	1512	60,6	—
2	1,5	0,0	1512	60,6	—
3	0,5	3,3	1487	49,0	++++
4	1,0	3,9	1375	53,6	++++
5	1,5	3,6	1187	42,7	++++
6	2,0	4,0	1075	43,0	++++
7	2,5	4,0	1240	49,6	++++
8	3,0	3,5	1350	47,2	+++
9	3,5	4,5	1280	57,6	+++
10	4,0	4,0	1370	54,8	+++
11	4,5	3,8	1487	56,5	+++
12	5,0	3,7	1487	55,0	++
13	5,5	4,0	1450	58,0	++
14	6,0	3,7	1575	58,2	+++
15	6,5	3,7	1575	58,2	+++
16	7,0	3,6	1625	58,5	—
17	7,5	3,6	1625	58,5	—
18	8,0	3,5	1687	59,0	—

Tabelle X.

Hund 20 kg. ♀ 0,25% Kongorot 2 ccm intraven.

Nr.	Galle	Gallensäure		Kochsalz		Kongorot in. d. Galle
		mg %	abs. M.	mg %	abs. M.	
1	2,4	1330	31,9	604	14,5	—
2	2,4	1330	31,9	604	14,5	—
3	2,5	1330	32,5	604	15,1	—
4	3,0	1330	39,0	699	21,0	+++
5	2,3	1420	32,7	604	13,9	+++
6	2,2	1450	31,9	614	13,5	+++
7	2,2	1500	33,0	614	13,5	+++
8	2,4	1540	37,1	619	14,8	+++
9	2,5	1540	38,5	609	15,2	+++
10	2,4	1450	34,8	614	15,7	++
11	2,6	1400	36,4	604	15,7	—
12	2,6	1330	34,6	604	16,7	—
13	2,6	1300	34,0	599	15,6	—
14	2,4	1330	32,0	604	14,5	—

abreicht werden, der Hauptteil der injizierten Gallensäure schon in den ersten 30 Minuten unter starker Vermehrung der Gallenmenge wieder in die Galle ausgeschieden wird, und 90–100% derselben innerhalb 1,5 bis 2 Stunden in der Galle wieder nachzuweisen sind. Hiernach scheint die Elimination der ins Blut eingebrachten Gallensäure in ziemlich kurzer Zeit zu erfolgen. Welche Rolle die Sternzellen hierbei spielen, ist uns gar nicht bekannt. Wir haben deswegen in der Weise untersucht, dass wir 260 mg glykocholsaures Natrium 1,5 Stunden nach der Injektion von 5 ccm Tusche-Lösung intravenös verabreichten. Das Ergebnis ist in Tabelle XI angegeben.

Tabelle XI.

Hund ♀ 20 kg. Tusche 5 ccm intrav. nachher taurocholsaures Na 260 mg intravenös.

Nr.	Galle (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Kochsalz	
		mg %	abs. M.	mg %	abs. M.		mg %	abs. M.
1	6,5	56,0	3,6	1050	68,2	18,7	531	34,5
2	5,0	66,3	3,4	1300	65,0	19,6	550	27,2
3	6,0	60,0	3,6	1160	66,6	19,3	541	32,5
4	5,6	55,0	3,1	1080	59,4	19,2	560	31,4
5	6,3	70,0	4,4	970	61,1	13,8	550	34,7
6	7,0	84,0	5,8	970	60,9	10,3	556	38,9
7	12,5	69,3	8,8	1710	213,7	24,5	507	63,9
8	8,1	70,0	5,7	940	76,1	13,4	546	44,2
9	7,2	82,0	5,9	705	50,8	8,6	555	40,0
10	6,7	85,0	5,7	725	48,2	8,4	560	37,6
11	6,5	86,8	5,6	765	49,7	8,8	570	37,0
12	5,8	89,1	5,2	819	45,1	9,1	560	32,5
13	5,5	92,4	5,1	855	46,8	9,2	560	30,8
14	4,5	109,3	4,8	907	40,8	8,3	555	25,2
15	4,4	117,3	5,2	932	40,9	7,9	555	24,4

Es zeigt sich, dass nach der Gallensäureinjektion die Gallenmenge sprungweise in die Höhe steigt, um schon nach einer Stunde

wieder abzusinken, ein Befund, der schon bei der Injektion von Gallensäure ohne Blockierung von Sakamoto festgestellt wurde. Das Bilirubin wird zu vermehrter Ausscheidung veranlasst. Was die Gallensäure anbelangt, so zeigt sie direkt nach der Gallensäureninjektion einen erheblichen Anstieg, um schon nach 30 Minuten kritisch abzufallen. Es ist klar zu sehen, dass die verabreichte Gallensäure innerhalb 1,5 bis 2 Stunden nicht vollkommen eliminiert wird, aber wenn man seine Aufmerksamkeit darauf lenkt, dass die Gallensäure trotz der Blockierung lange Zeit in relativ grosser Menge ausgeschieden wird, so dürfte man auch vermuten können, dass die vollkommene Elimination der injizierten Gallensäure wegen der Blockierung viel längere Zeit beansprucht, wie ohne Blockierung.

Aus diesen Befunden ist wohl anzunehmen, dass die Sternzellen bei der Elimination der ins Blut injizierten Gallensäure eine wichtige Rolle spielen.

IV. Diskussion.

Die Blockierung des retikuloendothelialen Systems mit Tusche, Elektralgol oder Lithioncarmin ruft bestimmte Veränderungen bei der Galle hervor. Die relative Konzentration des Kochsalzes wird am wenigsten beeinflusst; die absolute Menge der in einer Zeiteinheit sezernierten Gallensäure am intensivsten angegriffen. Die Veränderung der Gallensäuresekretion ist von der injizierten Menge der Blockierungsmittel abhängig: in je grösserer Menge die letzteren injiziert werden, desto auffallender nimmt die Gallensäure ab, und desto später tritt die Erholung derselben ein. Wenn Yonemura aus seinen Untersuchungen an 6-Stunden-Gallen geschlossen hatte, dass der Einfluss der Blockierung nicht länger als 24 Stunden dauert, so können wir nach unseren Resultaten ihm nicht beistimmen. Die Sekretion der Gallensäure kann bei einer grösseren Menge der Blockierungsmittel viel länger beeinflusst werden, oder bei einer kleineren schon nach wenigen Stunden sich erholen.

Bei der Kongorot-Injektion findet man ein ganz ähnliches Ver-

halten, nur in geringerem Grade. Hierbei wird die Gallensäure während des Stadiums der lebhaften Kongorotausscheidung zu verminderter Sekretion veranlasst, doch in geringerem Masse und für kürzere Dauer als bei der Carmininjektion.

Das Bilirubin verhält sich nicht in gleichem Sinne: bei der Blockierung mit Tusche neigt die Bilirubinmenge eher zur Verminderung, bei der mit Elektralgol dagegen zur Vermehrung und bei der Injektion von Lithioncarmin wird sie kaum in merklicher Weise beeinflusst. Das Verhalten der Bilirubinsekretion bei der Blockierung mit Tusche ist aus der wohlbekannten Tatsache leicht zu erklären, dass das Bilirubin hauptsächlich in den Retikuloendothelien gebildet wird; aber es ist schwer begreiflich, dass das Bilirubin durch Elektralgol vermehrt ausgeschieden wird. Wir haben zuerst den Verdacht gehegt, ob nicht das Bilirubin durch die Hämolyse zur vermehrten Sekretion angereizt würde. Deswegen wurde die Gefrierpunkterniedrigung der injizierten Mittel bestimmt, mit dem Resultate, dass sie für Tusche-Lösung $-1{,}98°C$, für Elektralgol-Kochsalzlösung $-0{,}45°C$, für Lithioncarmin $-1{,}74°C$, und für Kongorotlösung $-0{,}16°C$ betrug. Aus diesen Befunden allein konnten wir deswegen keine befriedigende Erklärung dafür finden, dass Elektralgol eine vermehrte Bilirubinausscheidung herbeiführt.

Nun kommen wir wieder zur Gallensäuresekretion zurück. Es stellte sich aus unseren Resultaten klar heraus, dass die Gallensäuresekretion bei der Blockierung zweifellos abnimmt, gleichviel durch welche Mittel die Blockierung erfolgt. Wie ist dieses Verhalten zu erklären? Um diese Frage zu beantworten, müssen wir zuerst klar stellen, wo die Gallensäuren eigentlich gebildet werden. Obwohl einige Autoren noch vermuten, dass sie auch ausserhalb der Leber gebildet werden können, so sind ihre Bestätigungen nicht völlig lückenlos, weil sie für den Nachweis der Gallensäure eine für diese nicht spezifische Reaktion wie die Pettenkofersche Reaktion angewandt haben. Andererseits häufen sich zahlreiche experimentelle und klinische Bestätigungen, welche die Bildung der Gallensäuren in der Leber vermuten lassen.

Setzen wir nun die Annahme als richtig voraus, dass die

Gallensäuren in der Leber gebildet werden können, so dürfen wir uns dies unter Berücksichtigung der Struktur der Leber so vorstellen, dass die Muttersubstanz der Gallensäure im Blute zuerst von den Sternzellen aufgenommen, dann zu den eigentlichen Leberzellen transportiert und schliesslich als Gallensäuren in die Gallenkapillaren ausgeschieden wird. Wenn die Sternzellen nun durch Blockierungsverfahren in der Weise in ihrer Funktion gestört oder gesättigt sind, dass sie nicht mehr genügend Muttersubstanzen der Gallensäuren aus dem Blute aufzunehmen imstande sind, so folgt daraus, dass die Bildung der Gallensäuren auch bei Intaktheit der Leberzellen beeinträchtigt werden wird. Man kann allerdings gegen diese Annahme etwa einwenden, dass die Gallensäuren bei der Blockierung zwar in der Leber gebildet werden, aber bloss nicht in die Galle ausgeschieden werden können. Diese Vermutung scheint uns nicht stichhaltig zu sein, denn wir haben klar zeigen können, dass die intravenös verabreichten Gallensäuren auch bei Blockierung zwar nicht schnell, aber doch noch eliminiert werden können.

Es muss jedoch als offene Frage einer zukünftigen Untersuchung vorbehalten werden, in welcher Weise die Sternzellen an der Bildung der Gallensäuren teilnehmen. Man dürfte sich hier vorstellen, entweder dass die Sternzellen die Muttersubstanz der Gallensäuren aus dem Blute aufzunehmen und als solche zu den Leberzellen zu transportieren imstande sind, oder dass sie sie erst nach Vorbearbeitung zu den Leberzellen übertragen, wo sie erst zu Gallensäuren umgebaut wird.

Wenn wir nun unsere Ergebnisse aus den Quotienten Gallensäure: Bilirubin betrachten, so ist von Interesse, dass die beiden Hauptbestandteile der Galle nicht immer in gleichem Masse sezerniert werden. Das Bilirubin wird, wie wohl bekannt, in den Sternzellen und Retikuloendothelien überhaupt erst gebildet und durch die Leberzellen in die Gallen ausgeschieden, gerade auf dem gleichen Weg, den wir bei der Sekretion der Gallensäuren angenommen haben. Trotz dieser Analogie wird die Bilirubinsekretion durch die Blockierung nicht so gestört wie die der Gallensäuren. Wir haben eine deutliche Dissoziation der beiden Substanzen vor

uns. Man kann hieraus schliessen, dass die Gallensäuresekretion gegen Eingriffe viel empfindlicher ist als die des Bilirubins.

V. Zusammenfassung.

Wie haben an Gallenblasenfistelhunden die Sekretion der Galle, insbesondere der Gallensäuren, bei der Blockierung der Retikuloendothelien untersucht, mit folgenden Ergebnissen:

1. Bei der Blockierung mit Tusche, Elektralgol und Lithioncarmin nimmt die Gallensäuresekretion auffallend ab. Lithiumcarbonat allein hat in der angewandten Dosis keinen Einfluss auf die Gallensäure.

2. Die Erholung der Gallensäuresekretion erfolgt desto schneller, je geringer die Menge der injizierten Blockierungsmittel ist.

3. Bei der Injektion von Kongorot nimmt die Gallensäure ebenfalls ab, aber nur in dem Stadium, in dem der Farbstoff in grösster Menge in die Gallen sezerniert wird. Die verminderte Sekretion der Gallensäure dauert deswegen nur kurze Zeit.

4. Die Bilirubinsekretion verhält sich ungleichmässig: nach der Blockierung mit Tusche neigt sie dazu abzunehmen, nach Elektralgol eher dazu zuzunehmen und nach Lithioncarmin bleibt sie unverändert.

5. Zwischen Gallensäure und Bilirubin besteht bei der Blockierung eine auffallende Dissoziation: die Gallensäuresekretion wird hierbei in höherem Grade angegriffen.

6. Die Konzentration des Kochsalzes in der Galle bleibt bei der Blockierung praktisch konstant; die ausgeschiedene absolute Menge desselben hängt völlig von der Gallenmenge selbst ab.

7. Bei der Blockierung erfolgt die Elimination der ins Blut eingebrachten Gallensäure langsamer als sonst.

8. Auf dieser Tatsachen ist kaum daran zu zweifeln, dass die Sternzellen bei der Bildung und Sekretion der Gallensäure eine wichtige Rolle spielen dürften.

LITERATUR.

Adler und Reimann (1925): Zs. f. d. ges. exp. Med., **47**, 617.
Elek (1924): Klin. Ws. 3. Jg. 143.
Foster and Hooper (1919): J. of biol. chem., **38**, 355.
Kumekawa (1926): Zs. d. Tokyo mediz. Gesellschaft, (japanisch), **40**, 805.
Nakagawa und Fujikawa (1930): diese Zs., **12**, 399.
Sakamoto (1931): diese Zs. **15**, 115.
Takeda (1930): Zs. f. d. exp. Med. (japanisch), 14: 6: 1.
Yonemura (1927): diese Zs., **7**, 101.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

THE BEHAVIOUR OF METHYLGLYOXAL IN WEAK ALKALINE SOLUTION.

By

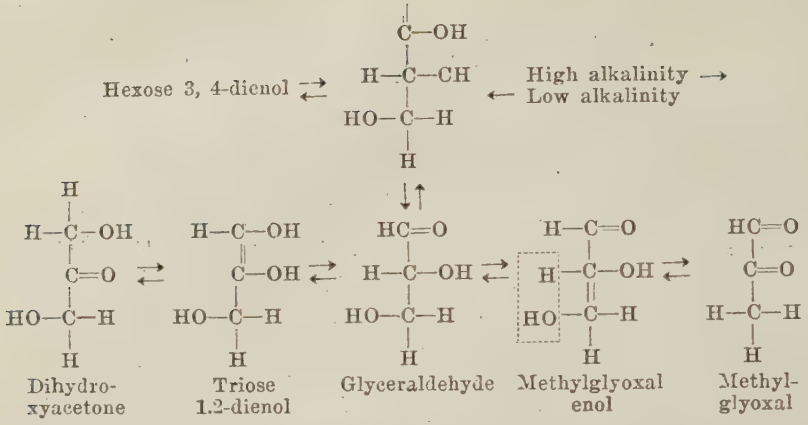
YOSHI ARAI.

(*From the Department of Biochemistry, Niigata Medical School, Niigata. Director: Prof. N. Ariyama.*)

(Received for publication, October 10, 1931.)

The investigation of methylglyoxal, as an intermediary product in the disintegration of the hexose molecule, has in itself a purely chemical attraction as well as the fascination of the reactions on biochemical grounds. Fairly conclusive results have been achieved in the studies of the production of methylglyoxal from sugars. However, remarkably little evidence has been available which could be brought to bear on the problem of the synthesis of sugars from methylglyoxal. In view of the great reactivity of methylglyoxal, it is highly probable that under suitable conditions such as in a weak alkaline medium it may undergo some changes to form trioses or to condense to higher sugars. But the transformations have turned out to be complicated reactions and there is at present no conclusive evidence enabling us to determine the nature of the products with certainty. The following scheme, presented by Shaffer and Friedemann (1930), may show the possible course of the transformation of methylglyoxal to trioses and hexoses.

Ariyama (1928) noticed that the yield of lactic acid transformed from methylglyoxal in a weak alkaline reaction, pH 9.0 to pH 10.5, was remarkably low in comparison to the amount of methylglyoxal consumed, while the conversion was quantitative at higher alkalinity, pH 12.5. Bernhauer and Görlich (1929) observed an increase of reducing power, followed by a slow decrease, when methylglyoxal was treated with magnesium, zinc or calcium carbonate. This initial increase of reducing power was interpreted by them to be the result of the formation of trioses from the



methylglyoxal, and the following decrease, to be the sequence of the synthesis of hexoses from the trioses. They claimed that they isolated several fractions of phenylosazones from the reaction products, one of the osazones corresponding to that of a triose (m.p.=132°) and the other to that of α-acrose (m.p.=213°). These results might well be construed so as to throw light upon the nature of the condensation products, but it may be doubted whether any finality has been reached as yet. As a matter of fact, Spoehr and Strain (1930), who studied extensively the effect of weak alkali (Na_2HPO_4 and Na_2CO_3) on glyceraldehyde, dihydroxyacetone and methylglyoxal, confirmed Bernhauer and Görlich's observation of the increase of reducing power in a weak alkaline solution of methylglyoxal but they failed to demonstrate the appearance of trioses in the solution. Fischler, Hauss and Täufel (1930) observed in their ultraviolet-spectroscopic study that the absorption exhibited by glucose in m/100 K_2CO_3 solution showed a tendency to disappear when the reaction of the solution was made slightly acid. They attributed this tendency of the disappearance of absorption to the possible resynthesis of glucose from methylglyoxal which had been produced from glucose.

It became necessary to extend the scope of the investigations so as to make certain the chemical nature of the transformations both in the quantitative and qualitative sense. Several attempts

to accomplish the synthesis of hexoses or trioses from methylglyoxal have so far been without success: definite condensation products were never identified in the forms of phenyl- and other osazones. The nature of these transformation products, it is hoped, will be dealt with later. The experiments presented herewith deal exclusively with the quantitative relations of the reaction products; that is, the decrease of methylglyoxal and the increase of reducing power, lactic acid and volatile acids. The author confirmed the observations of Bernhauer and Görlich, and of Spoehr and Strain with regard to the increase of reducing power of a weak alkaline solution of methylglyoxal. At the same time some volatile acids were found among the reaction products. These proved to be formic and acetic acids. In this connection Evans and his associates (1926 and 1928) found in their studies of the action of alkali on trioses and hexoses that the fate of the methylglyoxal, which was formed from sugars by the action of alkali, was decided by the concentration of the alkali used; thus in relatively weak alkali-concentration formic and acetic acids were the main products, while in a stronger alkaline medium lactic acid was the chief formation.

Experimental.

I. Methods.

Methylglyoxal was prepared by the Neuberg (1917) or by the Bernhauer and Görlich method of distilling dihydroxyacetone with dilute sulfuric acid. The samples thus prepared were always contaminated with acids. However, the amount of the acids was not sufficient to interfere with the experiments. The concentration of the methylglyoxal solutions was standardized by Friedemann's method (1927) and the subsequent determination was carried out by the colorimetric method of Ariyama (l. c.). The reducing power of the solution was measured by the method described by Somogyi (1926) and the lactic acid was determined by the Friedemann, Cotonio and Shaffer method (1927).

The total volatile acids were estimated quantitatively in the steam-distillate of the solution. Acetic and formic acids were determined mainly by the method of Evans and Hass (l. c.). In cases, where the bulk of methylglyoxal disappeared and the distillates were not contaminated with it, Riesser's method (1915/16) was also employed for the determination of the volatile acids. These two methods gave almost coinciding results.

The presence of acetic and formic acids was also proved qualitatively in the usual ways.

II. The Effect of Weak Alkali on Methylglyoxal.

A concentrated solution of methylglyoxal was diluted to 100 cc. with a buffer solution of desired hydrogen-ion concentration and kept at a constant temperature under mineral oil. At intervals a portion of the solution was pipetted out and analysed for the decrease of methylglyoxal and for the increase of lactic, formic and acetic acids, and of reducing power. The increase of reducing power shown in the following tables means the sum of the power apparently increased and that corresponding to the amount of methylglyoxal disappeared, and is expressed in terms of milligrams of glucose. The reducing substance or substances were non-fermentable. The formic acid, in amounts formed under the conditions of these experiments, did not respond at all to the increase of reducing power. Carbon dioxide was not produced. Methylglyoxal in an alkaline medium showed a tendency to caramelize and so disturbed the colorimetric determination after a 90% decrease of it. The data listed below represent the influence of alkalinity on the increase of the acids and reducing power of methylglyoxal solution (Table I–IV). The yields of the acids and reducing substance are also expressed as mols per mol of methylglyoxal which disappeared, under the assumption that a molecule of methylglyoxal disintegrates into a molecule of formic and acetic acid, and two molecules of methylglyoxal build up a molecule of glucose.

TABLE I. The Effect of Weak Alkali on Methylglyoxal.
At pH 10.90.

(108.8 mgm. methylglyoxal in 100 cc., 25°C.)

Time (hr.)	Decrease of methylglyoxal	Increase of products								
		Volatile acid	Lactic acid		Formic acid		Acetic acid		Reducing substance	
	mgm.	cc. 0.1N	mgm.	M*	mgm.	M*	mgm.	M*	mgm.	M*
2	97	0.2	12.9	0.10	0	0	1.2	0.02	23.0	0.09
4	100	0.4	12.0	0.10	0	0	2.4	0.03	25.4	0.10
6	104	0.4	12.5	0.10	0	0	2.4	0.03	25.8	0.10
24	106	1.6	16.8	0.13	0.9	0.01	2.4	0.03	22.9	0.09

*Mols per mol of methylglyoxal which disappeared.

TABLE II. At pH 9.48.

(94.61 mgm. methylglyoxal in 100 cc., 50°C.)

Time (hr.)	Decrease of methylglyoxal	Increase of products								
		Volatile acid	Lactic acid		Formic acid		Acetic acid		Reducing substance	
	mgm.	cc. 0.1N	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M
4	84	—	—	—	—	—	—	—	23.2	0.11
6	85	0.8	6.4	0.06	3.7	0.07	0	0	23.9	0.11
24	90	1.8	8.1	0.07	6.0	0.10	3.2	0.04	21.1	0.10
48	91	2.9	9.3	0.08	8.3	0.14	6.5	0.09	19.2	0.09
72	92	3.5	10.0	0.09	9.7	0.16	8.6	0.11	15.6	0.07

TABLE III. At pH 8.47.

(98.8 mgm. methylglyoxal in 100 cc., 50°C.)

Time (day)	Decrease of methylglyoxal	Increase of products								
		Volatile acid	Lactic acid		Formic acid		Acetic acid		Reducing substance	
	mgm.	cc. 0.1N	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M
1	93	1.8	5.8	0.05	6.4	0.11	2.4	0.03	27.6	0.12
2	94	2.0	6.4	0.05	6.4	0.11	3.6	0.05	30.5	0.13
3	95	2.2	6.6	0.06	6.4	0.11	4.8	0.06	27.8	0.12
4	96	2.2	8.8	0.07	6.4	0.11	4.8	0.06	26.3	0.11
5	96	2.2	8.9	0.07	6.4	0.11	4.8	0.06	24.5	0.10

Table IV. At pH 7.36.
(99.6 mgm. methylglyoxal in 100 cc., 50°C.)

Time (day)	Decrease of methylglyoxal	Increase of products								
		Volatile acid	Lactic acid		Formic acid		Acetic acid		Reducing substance	
	mgm.	cc. 0.1N	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M
1	89	0.8	2.7	0.02	3.7	0.07	0	0	20.0	0.09
2	91	1.0	3.7	0.03	3.7	0.06	1.2	0.02	22.6	0.10
3	93	1.1	4.2	0.04	4.2	0.07	1.2	0.02	23.4	0.10
4	93	1.2	4.3	0.04	4.6	0.08	1.2	0.02	24.5	0.11
5	94	1.2	5.5	0.05	4.6	0.08	1.2	0.02	22.0	0.09

III. The Influence of Temperature on the Increase of Reducing Power in the Weak Alkaline Solution of Methylglyoxal.

100 cc. of the solutions, which contained 100.0 mgm. of methylglyoxal, were mixed with 2 gm. of calcium carbonate and kept at 37°, 50° and 100°C respectively with frequent shaking. The reaction of the solutions was about pH 9 shortly after the shaking but became gradually more acid as the result of the production of the acids from methylglyoxal. Below are presented the protocols of the experiments (Table V–VII).

Table V. The Effect of Temperature on the Increase of Reducing Power of Methylglyoxal Solution. At 37°C.
(100.0 mgm. methylglyoxal in 100 cc., 2 gm. $CaCO_3$(pH ±9), kept under mineral oil.)

Time (day)	Decrease of methylglyoxal	Increase of products								
		Volatile acid	Lactic acid		Formic acid		Acetic acid		Reducing substance	
	mgm.	cc. 0.1N	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M
1	37.5	0.8	2.0	0.04	2.3	0.10	1.8	0.06	10.5	0.11
3	54.0	1.2	3.6	0.05	3.2	0.10	3.0	0.07	14.5	0.11
5	64.0	1.6	5.0	0.06	4.6	0.11	3.6	0.07	16.7	0.11
7	73.3	1.8	6.2	0.07	5.1	0.11	4.2	0.07	18.8	0.11
15	94	2.2	9.0	0.08	6.0	0.10	5.4	0.07	24.7	0.11
25	100.0	2.4	10.4	0.08	6.4	0.10	6.0	0.07	28.8	0.12
30	—	—	—	—	—	—	—	—	28.8	0.12
35	—	—	—	—	—	—	—	—	21.9	0.09

TABLE VI. At 50°C.
(100.0 mgm. methylglyoxal in 100 cc., 2 gm. $CaCO_3$, kept under mineral oil.)

Time (day)	Decrease of methylglyoxal	Increase of products								
		Volatile acid	Lactic acid		Formic acid		Acetic acid		Reducing substance	
	mgm.	cc. 0.1N	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M
1	56.3	1.6	5.4	0.08	2.8	0.08	6.0	0.13	16.6	0.12
3	75.9	2.2	7.5	0.08	3.7	0.08	8.4	0.13	23.4	0.12
5	89	2.6	9.0	0.08	4.6	0.08	9.6	0.13	26.1	0.12
7	95	3.0	10.8	0.09	5.5	0.09	10.8	0.13	26.5	0.11
10	100	3.0	10.8	0.09	5.5	0.09	10.8	0.13	25.1	0.11

TABLE VII. At 100°C.
(100.0 mgm. methylglyoxal in 100 cc., 2 gm. $CaCO_3$.)

Time (hr.)	Decrease of methylglyoxal	Increase of products								
		Volatile acid	Lactic acid		Formic acid		Acetic acid		Reducing substance	
	mgm.	cc. 0.1N	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M
0.5	64.5	1.8	5.0	0.06	2.8	0.07	7.2	0.13	18.3	0.11
1	80.4	2.4	6.7	0.07	3.7	0.07	9.6	0.14	22.1	0.11
2	92	2.8	9.0	0.08	4.6	0.08	10.8	0.14	22.1	0.10
4	99	3.1	12.5	0.09	5.5	0.09	11.4	0.14	22.3	0.09
8	100	—	14.0	0.11	—	—	—	—	22.3	0.09
10	—	3.2	—	—	5.5	0.09	12.0	0.14	22.0	0.09

IV. The Effect of Alkali Cyanide on Methylglyoxal.

Meyerhof (1925) pointed out that a very small amount of alkali cyanide remarkably accelerated the transformation of methylglyoxal to lactic acid. This catalytic action of cyanide was later substantiated by Ariyama (l. c.) but in another sense; that is, that the yield of lactic acid covered only a small part of the amount of methylglyoxal consumed and a large amount of acid of an unknown nature was produced. At a certain concentration of cyanide, the yield of lactic acid could be held down even to zero. He also found that the methylglyoxal solution which was added with

cyanide manifested strong reducing power in the cold. It was intended in this connection to test to what extent the reducing power might manifest itself in the presence of cyanide. The experiments were set up as follows: a solution which contained 200 mgm. of methylglyoxal was made up to 100 cc. with sodium hydroxide solution containing potassium cyanide and kept at 20°. The final concentrations of NaOH and KCN were 0.04N and 0.002N respectively; at these concentrations the production of lactic acid was checked to its minimum yield. The results are summarized in Table VIII.

Table VIII. Effect of KCN on Methylglyoxal.
(200.0 mgm. methylglyoxal in 100 cc., 0.04N NaOH, 0.002N KCN, 25°C.)

Time (min.)	Decrease of methylglyoxal	Increase of products									
		Total acid	Volatile acid	Lactic acid		Formic acid		Acetic acid		Reducing substance	
	mgm.	cc. 0.1 N	cc. 0.1n	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M	mgm.	M
1	190	10.4	5.6	1.2	0.01	24.0	0.20	2.4	0.02	54.1	0.11
10	191	10.4	5.6	1.7	0.01	24.0	0.20	2.4	0.02	55.0	0.12
60	193	11.6	6.8	5.4	0.03	24.0	0.20	9.6	0.06	54.7	0.11
80	195	12.2	7.0	4.0	0.02	24.0	0.20	10.8	0.07	54.0	0.11

Discussion.

When methylglyoxal is treated with alkali, the hydrogen-ion concentration of which is above pH 13, it is, as has been repeatedly observed, transformed quantitatively to lactic acid with great rapidity and the transformation is not accompanied by the production of acetic, formic and other acids or by the appearance of reducing power. At any pH lower than 13 the production of lactic acid can not, however, keep up with the decrease of methylglyoxal and at the same time the formation of acetic and formic acids begins and also the increase of reduction value. Thus, already at pH 10.9 the production of lactic acid did not exceed 13% of the methylglyoxal decreased and the production diminished continuously with the decrease in alkalinity (Table I–IV). At pH 7.36 lactic acid corresponded only to 3–5% of the methylglyoxal disappeared.

The increase in reducing power was an increasing function of hydrogen-ion concentration, until pH 8.5 was reached, after which it was a decreasing function. The reducing power was also a function of time. At pH 10.9 and 9.5 the reduction value rose to a maximum after 6 hours and then it receded, while the value was the highest after 2 days at pH 8.5 and after 4 days at pH 7.4. This increase in reducing power was, however, too small to account for the quantitative formation of either trioses or of hexoses from the methylglyoxal, the disappearance of which was not wholly explained by the transformation to lactic and volatile acids. Whatever its actual magnitude, the increase in reducing power is an interesting fact when we consider the readiness with which methylglyoxal may possibly undergo condensation.

The production of acetic and formic acids has been ascribed by Evans and his co-workers to the decomposition of methylglyoxal into acetaldehyde and carbon monoxide, which in turn yield acetic and formic acids. The amounts of these volatile acids diminished with hydrogen-ion concentration greater or less than pH 9.5. If a molecule of methylglyoxal undergoes a cleavage into a molecule of formic and acetic acid, these acids should then be always present in an equimolecular ratio. In point of fact, however, the yield of one acid overcome that of the other, according to the conditions of the experiments. Thus the formic: acetic acid ratio showed a tendency to become greater with the decrease of alkalinity.

Besides the concentration of alkali the temperature is also an experimental factor which exerts an influence on the quantity of reaction products. It is demonstrated in Table V, VI and VII that the $CaCO_3$-alkaline solution of methylglyoxal showed a tendency to manifest a stronger reducing power at a lower temperature while the yields of the acids were larger at a higher temperature except for formic acid. The ratio between the amounts of formic and acetic acids is also a function of the temperature: at 37° more formic acid was formed than acetic acid but at 50° or 100° the relation became just the reverse.

In the presence of cyanide a great increase in the reducing power is expected from the fact that the methylglyoxal solution

shows intensive reduction in the cold and that the conditions are favourable for the usual organic synthesis. The addition of cyanide resulted in an increase of reducing power, indeed, but did not show any particular influence on the production of the power as compared with the cases of weak alkali (Table VIII). It is open to question whether the same reducing substance would be formed as in the cases of weak alkali, the cyanide accelerating only the velocity of the reaction, or the cyanide would actually take part in the synthesis of the molecule of the reducing substance. The acids other than lactic acid which were formed in the presence of cyanide were, chiefly, of volatile nature and were found to contain formic and acetic acids.

Summary.

1. When methylglyoxal was treated with alkali, the hydrogen-ion concentration of which was below pH 13, the transformation of methylglyoxal into lactic acid was not quantitative. Over and besides lactic acid, formic and acetic acids, and some reducing substance or substances of an unknown nature were produced. The sum of these reaction products was not sufficient to account for the amount of methylglyoxal which disappeared.

2. Alkalinity and temperature were important factors which exerted influence on the quantity of the reaction products.

3. An appreciable increase of reducing power was also noticed when the disappearance of methylglyoxal was greatly accelerated by the addition of alkali cyanide.

REFERENCES.

Ariyama, N. (1928): J. Biol. Chem., **77**, 359.

Bernhauer, K. and Görlich, B. (1929): Biochem. Z., **212**, 452.

Evans, W. L. and Cornthwaite, W. R. (1928): J. Amer. Chem. Soc., **50**, 486.

Evans, W. L., Edgar, R. H. and Hoff, G. P. (1926): J. Amer. Chem. Soc., **48**, 2665.

Evans, W. L. and Hass, H. B. (1926): J. Amer. Chem. Soc., **48**, 2703.

Evans, W. L. and Hutchman, J. E. (1928): J. Amer. Chem. Soc., **50**, 1496.

Evans, W. L. and O'Donnel, D. C. (1928): J. Amer. Chem. Soc., **50**, 2543.

Fischler, F., Hauss, H. and Täufel, K. (1930): Biochem. Z., **227**, 157.

Friedemann, T. E. (1927): J. Biol. Chem., **73**, 331.

Friedemann, T. E., Cotonio, M. and Shaffer, P. A. (1927): J. Biol. Chem., **73**, 335.

Meyerhof, O. (1925): Biochem. Z., **159**, 432.

Neuberg, C., Färber, E., Levite, A. und Schwenk, E. (1917): Biochem. Z., **83**, 262.

Riesser, O. (1915/16): Z. physiol. Chem., **96**, 355.

Shaffer, P. A. and Friedemann, T. E. (1930): J. Biol. Chem., **86**, 345.

Somogyi, M. (1926): J. Biol. Chem., **70**, 607.

Spoehr, H. A. and Strain, H. H. (1930): J. Biol. Chem., **89**, 503.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

ÜBER DEN EINFLUSS DER NICHTELEKTROLYTE AUF DIE KOAGULATION DES GOLDHYDROSOL.

Von

H. TSUTSUI.

(*Aus dem physikochemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Sendai. Direktor: Prof. S. Mitsukuri.*)

(Eingegangen am 14. Oktober 1931)

Freundlich und Rona (1917) haben den Einfluss der oberflächenaktiven Nichtelektrolyte auf die Koagulation der Kolloide untersucht. Sie fanden dabei, dass diese Stoffe allein keinen Einfluss auf ein Kolloid erkennen lassen, konnten aber zeigen, dass die Stoffe die Empfindlichkeit des Sols gegen Elektrolyte erhöhen. Sie sind auch an den Grenzflächen wirksam, an denen eine Adsorption nicht nachweisbar ist. Seitdem sind viele Arbeiten über das Thema erschienen, von denen besonders die Untersuchungen von Jirgensons und Janek (1927) zu erwähnen sind. Ich nahm nun den folgenden Versuch vor, um die Frage zu beantworten, wie die verschiedenen Nichtelektrolyte die Einwirkung des NaCl auf den Goldhydrosol beeinflussen, und ob diese Wirkung in einer erkennbaren Beziehung zur Oberflächenaktivität steht. Den Goldhydrosol stellte ich nach der Phosphormethode her. Er war hoch dispers und von gelbroter Farbe. Ultramikroskopisch untersucht, bestand er fast aus Mikronen. Bei allen Versuchen kamen reinste Chemikalien (Kahlbaum und Merck) und Wasser, welches durch den Silberkühler redestilliert wurde, zur Verwendung. Alle Gefässe wurden mit dem Wasserdampf gereinigt. Ich nahm dann 5 ccm Sol und setzte das Wasser, den Nichtelektrolyt und Kochsalzlösung hinzu. Das gesamte Volumen betrug 10 ccm. Fünf Minuten nach dem Zusammengiessen wurden die Reagenzgläser mit schwarzem Papier umwickelt und von oben auf weissem Grund beobachtet. Es wurde bestimmt, in welchem Reagenzglas violette Farbe konstatierbar war, und diese Stelle als Koagulationswert des

Goldhydrosols definiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass die kleinste Farbendifferenz deutlich unterschieden werden kann. Anderseits untersuchte ich kolorimetrisch genauer. Swedberg hat kinetisch die Koagulationsgeschwindigkeit des Goldsols mittels Donnan's Kolorimeter verfolgt. Bei meinem Versuch gebrauchte ich statt dessen Authenrith u. Königbergers, bei welchem zwar kinetische Messung unmöglich, aber die Vergleichung der Farbe möglich ist. Beim Zusammengiessen von 0,2 ccm Propyl-, Isopropyl- resp. Normalbutylalkohol mit 5 ccm Sol trat ein Hauch der Goldpartikelchen an der freien Oberfläche auf. Dabei sind Propyl- u. Isopropylalkohol nur mässig mit Wasser mischbar und N-Butylalkohol soll sich zu etwa 7% in Wasser lösen. Früher fand Winkelbach dasselbe Phänomen bei mit Wasser schwer mischbaren Stoffen, z. B. Anilin, Benzol, Chloroform u.s.w. Dagegen widerlegte Zsigmondy diesen Versuch und schrieb die Ursache dem Vorhandensein von groben Partikelchen zu. Es wurde also von mir als neue Tatsache festgestellt, dass Goldhydrosol sich schon durch die mit Wasser nur mässig mischbaren kapillaraktiven Stoffe in gewissem Grade koagulieren liess. Methyl- und Ätylalkohol, Kampfer, Thymol, Ethylurethan und Harnstoff fördern die Sensibiliserung. Der Gehalt des Sol an Traubenzucker hat keinen besonderen Einfluss darauf. Das glykocholsaure Natrium ist wie bekannt ein typisch kapillaraktiver Stoff. Wenn der Sol 0,1016 g Salz pro Liter enthält, findet die Koagulation nicht statt. Die Kochsalzkonzentration war dabei von 18 bis 48 Millimol pro Liter. Den Mechanismus der Sensibilisierung fassten Freundlich und Rona so auf, dass die Nichtelektrolyte von den Grenzflächen adsorbiert werden und in denjenigen Konzentrationen, in denen sie in den Grenzschichten vorhanden sind, einen Einfluss auf die Dielektrizitätskonstante ausüben. Infolgedessen glaubten Freundlich und Rona, das die elektrostatische Wirkung beider Lagen der elektrischen Doppelschicht durch die Nichtelektrolyte in solchem Sinn beeinflusst werde, dass der Potentialunterschied der Doppelschicht verkleinert wird.

$$E = \frac{yr(r-d)}{d}$$

Volumprocent	Koagulationswert (Millimol pro Liter)		Volum-% der gesättigten Lösung	Koagulationswert		(Millimol pro Liter)	Koagulationswert	
0	40	40	0	35	40	0	39	39
2	38	38	2	32	34	20	33	35
4	30	38	4	28	32	40	27	30
6	26	32	6	26	28	60	24	28
10	28	25	10	23	18	100	20	18
	Methylalkohol	Äthylalkohol		Kampfer	Thymol		Ethylurethan	Harnstoff

Kolorimetrischer Versuch: Zeitdauer bis zum Eintritt der violetten Farbe in Sekunden.

Zeit	∞	∞	∞	5′	0	NaCl-Gehalt 18 Millimol pro Liter
(Millimol pro Liter Ethylurethan)	0	20	40	60	100	

Zeit	∞	20′	10′	5′	0	NaCl-Gehalt 24 Millimol pro Liter
Volum-% Methylalkohol	0	2	4	6	10	

Zeit	∞	15′	10′	5′	0	NaCl-Gehalt 24 Millimol pro Liter
Volum-% Äthylalkohol	0	2	4	6	10	

Zeit	∞	15′	10′	5′	0	NaCl-Gehalt 18 Millimol pro Liter
Volum-% Gesättigte Kampferlösung	0	2	4	6	10	

Zeit	∞	10	5′	0	0	NaCl-Gehalt 18 Millimal pro Liter
Millimol pro Liter Harnstoff	0	20	40	60	100	

Diese Theorie bedarf jedoch der Ergänzung, weil Sensibilisierung und Stabilisierung neuerdings bei denselben Nichtelektrolyten nachgewiesen worden sind. Nach Bechhold, Blitz und Neisser soll die Agglutination vielleicht in die Gruppe der Sensibilisierungserscheinungen eingezogen werden. Das Agglutinin gehört wahrscheinlich zu dem oberflächenaktiven Stoffe, der auch die Bakteriensuspensionen gegen Elektrolyte empfindlich macht. Zum Schlusse möchte ich nicht verfehlen, meinem Lehrer Herrn Prof. S. Mitsukuri meinen besten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

Freundlich, H. u. Rona (1917): Bioch. Zs., **81**, 87.
Matsuno, Y. (1924): Bioch. Zs., **150**, 159.
Jirgensons, Br. (1928): Koll. Zs., **46**, 114.
Janek, A. u. Jirgensons, Br. (1927): Koll. Zs., **41**, 40.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL. XII.

Glykogenbildung der Leber durch Gallensäure und das vegetative Nervensystem.

Von

TOSHIO MIKI.

(*Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Okayama. Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.*)

(Eingegangen am 19. Oktober 1931)

Seit Claude Bernard ist bekannt, dass der Zuckerstich in die Medulla oblongata Hyperglykämie und Glykosurie hervorruft. Die Frage, ob der Zuckerstich auf dem Umwege über die Nebenniere durch Adrenalinausschüttung zuckermobilisierend wirkt, oder ob der nervöse Reiz durch den N. splanchnicus unmittelbar zur Leber gelangt, steht noch offen. Die heutige Auffassung ist im allgemeinen die, dass die Wirkung des Stiches zum Teil auf direkter Reizung sympathischer glykosekretorischer Lebernerven beruht, teils und wahrscheinlich zur Hauptsache auf einer über die Nebennieren hinweg ausgelösten Adrenalinämie, durch welche die gleichen Lebernerven peripher in Erregung versetzt werden. Seit Aschner (1912) ist auch bekannt, dass durch Verletzung einer bestimmten Stelle im Zwischenhirn, nämlich der Regio hypothalamica, ebenfalls Glykosurie hervorgerufen werden kann. Später haben viele Autoren wie Dresel (1923), Camus, Gournay u. Grand (1925) sowie Sachs u. Macdonald (1925), weiteres gebracht. Nach Dresel u. Lewy (1922) soll es nach Abtrennung beider Corpora striata zu einer langdauernden Hyperglykämie kommen, die im Gegensatz zur Piqûre und zum Hypothalamus-Zuckerstich nicht vorübergehend sein, sondern bis zum Tode der Versuchstiere anhalten soll. Nach ihnen sollte das Zentrum für den Zuckerstoffwechsel zentralwärts von der Medulla oblongata liegen.

Jedenfalls ist der Schluss erlaubt, dass der Zuckerstoffwechsel

von einer umschriebenen Stelle im Gehirn reguliert wird, und dass zentrale Sympathikusreizung Hyperglykämie im Gefolge hat, die durch die einsetzende Mobilisation von Zucker aus dem Leberglykogen bedingt ist. Ob diese Sympathicusreizung an dem im Hirnstamm befindlichen sympathischen Zentrum primär angreift, ist noch unbekannt.

Andererseits wurde durch die Untersuchungen von Brugsch, Dresel u. Lewy (1923) sowie La Barre (1927/28) klargestellt, dass der Stich in den vorderen Teil des dorsalen Vaguskernes in der Medulla oblongata Hypoglykämie und Insulinausschüttung ins Blut aus den Langerhansschen Inseln im Pankreas hervorruft.

Es steht ausser allem Zweifel, dass die innere Sekretion des Pankreas durch nervöse Impulse, die ihren Ursprung im Vagus haben, beeinflusst wird, und dass die Wirkung der Vagusreizung auf den Kohlehydratstoffwechsel auf dem Umwege der Sekretion eines besonderen Hormons, nämlich des Insulins, zustandekommt. Wie die Pankreasinseln dem Sekretionsreiz des Vagus unterstehen, so die Schilddrüse und die Nebennieren dem sympathischen Nervensystem. Die Sympathicuserregung führt zur verstärkten Sekretion des Schilddrüseninkrets und des Adrenalins, wie Cannon u. Smith (1922) beim Schilddrüseninkret nachgewiesen haben.

Nach Rupp (1925) kann es im Ruhezustande auch ohne Impulse vom Zentralnervensystem aus zu gleichmässiger Abgabe von Zucker nach Ausschaltung der sympathischen Nervenendigung in der Leber, z. B. durch Splanchnicusdurchschneidung, kommen, und zwar unter der Voraussetzung intakter Durchblutung und unveränderter hormonaler Beeinflussung der Leber. Der plötzlich notwendig werdende Nachschub von Zucker aus der Leber z. B. bei erheblicher Zuckerverarmung der Peripherie scheint ohne Vermittelung des Nervensystems nicht möglich zu sein. So hat Rupp (1925) gezeigt, dass nach Durchschneidung der Nn. splanchnici und Zufuhr von Insulin der Blutzucker sehr lange hypoglykämische Werte aufweist.

Offenbar veranlasst das Sinken des Blutzuckers regulatorisch zentrale Sympathicusreizung, deren Folge vermehrte Diastasierung des Leberglykogens ist, die wieder reparatorische Blutzuckersteige-

rung auslöst.

Es ist auch bekannt, dass das Adrenalin und Tyroxin die Sympathicuswirkung hinsichtlich der Aktivierung des diastatischen Prozesses in der Leber unterstützt. Aber nach Siegel (1929), Pollak (1909) und Cori (1929) ist das Adrenalin in kleinsten Mengen ein Aufbauhormon des Leberglykogens. Kurz, man kann die wesentliche Funktion des sympathischen Systems in der Aufrechterhaltung der normalen Zuckerversorgung aller Gewebe sehen. Für die Stoffwechselregulation kommt vor allem nur der abdominale Teil des Nervus vagus in Betracht. Die einzige inkretorische Drüse, die nach Lombroso (1928) und La Barre (1927) ohne Zweifel dem Vagussystem zugeteilt ist, stellt das System der Langerhansschen Inseln dar, und der Nervus vagus ist der Sekretionsnerv desjenigen Hormons, nämlich des Insulins, das zur Assimilation des mit der Nahrung zugeführten Zuckers dient. Während Reizung des Sympathicus allein den Glykogenaufbau fördert, scheint nach Isaac u. Siegel (1929) sowie La Barre (1927) der Vagus beim Aufbau des Glykogens nicht unmittelbar, sondern nur insoweit beteiligt zu sein, als er die Insulinsekretion anregt. Nach La Barre (1927) wird bei allgemeiner sympathischer Reizung durch Adrenalin nicht nur Zucker mobilisiert, sondern gleichzeitig das vagische Assimilationshormon (Insulin) in erhöhtem Masse sezerniert. Es besteht also keine antagonistische Beziehung zwischen Insulin und Adrenalin. Nun wurde durch die Untersuchung vieler Autoren, wie Misaki (1927), Fuzita (1930/31), Okamura (1930) und Chikamori (1930), bewiesen, dass die Gallensäure auf den Sympathicus lähmend und auf den Vagus reizend wirkt, indem die hypoglykämische und hypercalcämische Wirkung der Gallensäure durch Splanchnikotomie aufgehoben werden, während die erstere Wirkung durch Vagotomie herabgesetzt, letztere dagegen verstärkt wird.

Nach Taku soll die die Kreatininausscheidung hemmende Wirkung der Gallensäure durch Splanchnikotomie aufgehoben werden, und Taku und Kaziro fanden bei der Kreatininausscheidung im Harn, dass die Gallensäure und das Adrenalin antagonistisch zueinander wirken. Aus ihren Resultaten haben sie

den Schluss gezogen, dass die Gallensäure auf den Sympathicus lähmend wirkt. Nach Tsuji (1930) und Taku (1931) soll die Gallensäure auf das sympathische Zentrum lähmend wirken, indem einerseits der durch Zuckerstich auftretende Harnzucker durch Zufuhr der Gallensäure abnimmt, und andererseits die Temperatursteigerung, die durch das den Sympathicus reizende Tetrahydro-β-naphthylamin hervorgerufen wird, und die vermehrte Kreatininausscheidung durch Mitzufuhr von Gallensäure ausgeglichen werden.

Nach all dem Obigen ist anzunehmen, dass die Glykogenbildung in der vom vegetativen Nervensystem innervierten Leber durch Gallensäure beeinflusst wird. Unter dieser Annahme habe ich die Glykogenbildung der Leber von splanchnikotomierten und vagotomierten Kaninchen untersucht, indem ich Gallensäure zuführte.

Experimenteller Teil.

Zum Versuch wurden gut ausgewachsene Kaninchen verwendet, die lange mit Okara und Gemüse gefüttert worden waren. Die Splanchnikotomie wurde nach Schulze (1900) ausgeführt und die Vagotomie in der Weise vorgenommen, dass die beiden Nervi vagi dicht unter dem Zwerchfell durchschnitten wurden. Die Versuchstiere erholten sich in einigen Tagen und frassen wieder wie vor der Operation. Vom 13. Tage nach der Nervendurchschneidung an mussten die Kaninchen 4 Tage lang fasten, damit die Leber ungefähr glykogenfrei wurde. Dann wurden diesen Tieren je 3–4 g d-Glukose pro kg Körpergewicht ohne oder mit 0.3 g Cholsäure pro kg Körpergewicht per os einverleibt. Weiter wurde $1\frac{1}{2}$ Stunden darauf das Sympathicusgift Ergotamin subkutan injiziert. 3 Stunden nach Verfütterung der Glukose ohne oder mit Cholsäure wurden die Kaninchen mittels Nackenschlags getötet und die schnell herausgeholte Leber gewogen. Das Glykogen der Leber wurde nach der Pflügerschen Methode bestimmt. Als Kontrolle wurde der Glykogengehalt der Leber von normalen Kaninchen nach der Verabreichung von Glukose ohne oder mit Cholsäure in gleicher Weise untersucht. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I–IV zusammengestellt.

1. Zufuhr von Glukose ohne oder mit Cholsäure bei normalen Kaninchen.

Nach Tabelle I A betrug der Glykogengehalt der Leber von nichtneurotomierten Kaninchen bei Zufuhr von Glukose allein durchschnittlich 0.48%. Bei Zufuhr von Glukose mit Cholsäure wurde, wie Fuzita (1930) in seinem Versuch bewiesen hat, der Glykogengehalt der Leber gesteigert, und er belief sich durchschnittlich auf 0.5534%. Bei Zufuhr von Cholsäure neben Glukose wurde also der Glykogengehalt der Leber durchschnittlich um 0.0734% höher gefunden als der bei Zufuhr von Glukose allein. Daraus ergibt sich, dass der Glykogengehalt der Leber durch Fütterung von Cholsäure um 11.12% vermehrt wurde.

Tabelle I. (Kontrolle)

A.

Nr.	Körpergewicht vor dem Hungern	Körpergewicht nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	Glykogen (%)	Bemerkungen
1	2400	2200	48.7	0.500	Glukose 3 g pro kg
2	2600	2400	43.2	0.476	
3	2400	2200	60.2	0.500	
4	—	2200	48.8	0.454	
5	—	2100	47.0	0.500	
6	—	2200	52.4	0.454	
		Durchschnittswert		0.480	

B.

Nr.	Körpergewicht vor dem Hungern	Körpergewicht nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	Glykogen (%)	Bemerkungen
1	2000	1800	36.1	0.522	Glukose 3 g Cholsäure 0.3 g pro kg
2	2250	2000	40.3	0.400	
3	—	2100	40.6	0.555	
4	—	2100	47.3	0.666	
5	—	2100	47.2	0.624	
		Durchschnittswert		0.5534	

2. Zufuhr von Glukose ohne oder mit Cholsäure bei splanchnikotomierten Kaninchen.

Bei diesem Versuch wurde den Kaninchen die Cholsäure als 1%ige Cholatlösung unter Zusatz von Glukose per os einverleibt. Nach Tabelle II A und B war der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Glukose allein, sowohl von 3 g als auch von 4 g pro kg Körpergewicht, bei den splanchnikotomierten Kaninchen etwas kleiner als der bei den normalen Kaninchen; er betrug durchschnittlich 0.407% bei Zufuhr von 3 g und 0.43% bei der von 4 g. Auch bei Zufuhr von Glukose mit Cholsäure zeigte er einen etwas kleineren Wert als beim normalen Kaninchen, sowohl bei der von 3 g Glukose mit 0.3 g Cholsäure als auch bei der von 4 g Glukose mit 0.4 g Cholsäure; er betrug im ersteren Falle durchschnittlich 0.433% und im letzteren 0.545%. Es wurde also der Glykogengehalt der Leber der splanchnikotomierten Kaninchen durch Zufuhr von Cholsäure durchschnittlich um 0.026% oder 0.115% vermehrt, was etwa 6.4% oder 26.7% des originalen Wertes entspricht.

Aus dem allen ergibt sich, dass die Cholsäure sowohl bei normalen als auch bei splanchnikotomierten Kaninchen die Glykogenbildung der Leber fördert, nur dass diese Förderung bei den letzteren nicht so stark wie bei den ersteren ist.

Die Glykogenbildung der Leber bei Zufuhr von Glukose sowohl mit als auch ohne Cholsäure wird in gleicher Weise durch Splanchnikotomie herabgesetzt, und zwar bei ersterer durchschnittlich um 15.2% und bei letzterer um 21.8%. Diese Herabsetzung der Glykogenbildung der Leber von splanchnikotomierten Kaninchen tritt stärker bei Zufuhr von Glukose mit Cholsäure als bei der von Glukose allein ein. Danach führt also beim splanchnikotomierten Kaninchen die Zufuhr der Cholsäure zu stärkerer Herabsetzung der Glykogenbildung in der Leber. Dass die Cholsäure auf den Sympathicus lähmend und auf den Vagus reizend wirkt, ist bereits von Tsuji (1930), Sekito (1930) und Taku (1929/30) festgestellt worden. Weiter wissen wir, dass die Überfunktion des einen vegetativen Nervensystems zwangsläufig zu erhöhter Aktivität des anderen führt. Somit scheint mir die durch die Cholsäure ver-

Tabelle II. (Splanchnikotomie)

A.

Nr.	Körpergewicht vor dem Hungern	Körpergewicht nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	Glykogen (%)	Bemerkungen
1	1950	1800	42.7	0.500	Glukose 3 g pro kg
2	2200	1700	37.8	0.385	
3	2000	1600	31.2	0.385	
4	2400	2200	51.5	0.416	
5	2200	1800	42.5	0.401	
6	2050	1700	38.0	0.375	
7	2300	2000	40.0	0.385	
		Durchschnittswert		0.407	
8	2100	2000	41.0	0.434	Glukose 4 g pro kg
9	2200	2100	43.0	0.454	
10	2200	2100	53.3	0.434	
11	2100	1900	44.6	0.400	
		Durchschnittswert		0.430	

B.

Nr.	Körpergewicht vor dem Hungern	Körpergewicht nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	Glykogen (%)	Bemerkungen
1	2100	1600	36.3	0.434	Glukose 3 g Cholsäure 0.3 g pro kg
2	2100	1700	43.2	0.476	
3	2200	1800	36.3	0.401	
4	2160	1900	36.9	0.452	
5	2200	1800	37.5	0.401	
6	2100	1700	45.3	0.434	
		Durchschnittswert		0.433	
7	2100	2000	40.7	0.500	Glukose 4 g Cholsäure 0.4 g pro kg
8	2000	1900	49.2	0.555	
9	2300	2200	49.5	0.526	
10	2200	2200	44.7	0.588	
11	2150	2100	44.0	0.555	
		Durchschnittswert		0.545	

stärkte Herabsetzung der Glykogenbildung der splanchnikotomierten Kaninchenleber durch die Überfunktion des sympathischen Nervensystemes in der Leber bedingt zu sein, zu der es einerseits durch die Splanchnicusdurchschneidung nach Schulze und andererseits infolge der Gegenregulation der vegetativen Nerven durch die durch Cholsäure ausgelöste Vagusreizung kommen dürfte. Obwohl die Cholsäure auf das sympathische Nervensystem lähmend wirkt, genügt wohl die bei unseren Versuchen gebrauchte Cholsäuremenge nicht, die durch das Mehrfunktionieren des Sympathicus zustandekommende Wirkung abzudämpfen. Um festzustellen, ob letzteres wirklich der Fall ist, habe ich im nächsten Versuch dem splanchnikotomierten Kaninchen das sympathicuslähmende Gift Ergotamin mit oder ohne Cholsäure percutan einverleibt und die Glykogenbildung der Leber beobachtet.

3. Zufuhr von Glukose mit Ergotamin ohne oder mit Cholsäure beim splanchnikotomierten Kaninchen.

Auch diesmal wurden 0.4 g Cholsäure pro kg Körpergewicht als 1%ige Cholatlösung mit 4 g Glukose pro kg Körpergewicht dem splanchnikotomierten Kaninchen gelöst per os einverleibt. 1½ Stunden darauf wurde pro Kilo Körpergewicht 1 ccm 0.05%iger Ergotaminlösung subcutan injiziert und nach weiteren 1½ Stunden der Glykogengehalt der Leber untersucht.

Nach Tabelle III A und B betrug der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Glukose mit Ergotamin durchschnittlich 0.474% und der bei Zufuhr von Glukose mit Ergotamin und Cholsäure 0.59%.

Der Glykogengehalt der Leber bei Mitzufuhr des Ergotamins war im Vergleich mit dem bei Zufuhr von Glukose allein um 10.23% und der bei Mitzufuhr des Ergotamins, verglichen mit dem bei Zufuhr von Glukose mit Cholsäure, um 8.25% höher. Danach wird die Glykogenbildung der Leber des splanchnikotomierten Kaninchens durch Zufuhr von Ergotamin mit oder ohne Fütterung von Cholsäure bis zu einem gewissen Grade verstärkt. Es ist schon allgemein bekannt, dass das Ergotamin elektiv auf die Endigungen der sympathischen Nerven lähmend wirkt. Andererseits nimmt man,

Tabelle III. (Splanchnikotomie)

A.

Nr.	Körpergewicht vor dem Hungern	Körpergewicht nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	Glykogen (%)	Bemerkungen
1	2100	2000	33.5	0.500	Glukose 4 g Ergotamin 1.0 ccm (0.05%) pro kg
2	2150	1900	49.0	0.476	
3	2000	1300	35.5	0.434	
4	2200	2000	37.0	0.454	
5	2500	2100	39.0	0.476	
6	2200	2000	39.2	0.500	
7	2300	2200	45.8	0.476	
		Durchschnittswert		0.474	

B.

Nr.	Körpergewicht vor dem Hungern	Körpergewicht nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	Glykogen (%)	Bemerkungen
1	2100	2000	50.5	0.588	Glukose 4 g Cholsäure 0.4 g Ergotamin 1.0 ccm (0.05%) pro kg
2	2050	1800	53.2	0.526	
3	1900	1900	46.2	0.625	
4	2000	1700	34.4	0.555	
5	2050	1700	35.4	0.588	
6	2350	2000	53.1	0.625	
7	2200	1800	46.1	0.625	
8	2000	1700	45.1	0.588	
		Durchschnittswert		0.590	

wie oben schon erwähnt, allgemein an, dass die Reizung des Sympathicus den Zucker mobilisiert. Alle obigen Tatsachen drängen zu der Annahme, dass beim splanchnikotomierten Kaninchen die sympathischen Nerven in Erregung versetzt sind, wodurch es im Vergleiche mit dem normalen Kaninchen in der Leber zu schwächerer Glykogenbildung kommt, und zwar sowohl bei Zufuhr von Glukose allein als auch bei der von Glukose mit Cholsäure, obgleich letztere auf den Sympathicus lähmend wirkt. Nach den

Tabellen I B, II B und III B ist der Glykogengehalt der Leber der splanchnikotomierten Kaninchen bei Zufuhr von Glukose mit Cholsäure und Ergotamin höher als der bei Zufuhr von Glukose mit Cholsäure allein. Doch war bei den splanchnikotomierten Kaninchen die verabreichte Glukosemenge mit Cholsäure etwas grösser als bei den normalen Tieren.

Aus den Resultaten kann man den Schluss ziehen, dass sich die sympathischen Nerven der Leber von nach Schulze splanchnikotomierten Kaninchen in Erregung befinden, und dass die lähmende Wirkung der Cholsäure bei peroraler Zufuhr nicht ausreicht, diese Erregung zu unterdrücken.

4. Zufuhr von Glukose ohne oder mit Cholsäure beim vagotomierten Kaninchen.

Nach der Tabelle IV A und B ist der Glykogengehalt der Leber der vagotomierten Kaninchen bei Zufuhr von Glukose allein viel kleiner als der der normalen und beträgt durchschnittlich 0.3224%, wie das auch bei der Splanchnikotomie der Fall war. Die Glykogenbildung der Leber wird also durch Vagotomie genau wie durch Splanchnikotomie unter die Norm herabgesetzt. Diese Herabsetzung ist bei der Vagotomie viel deutlicher als bei der Splanchnikotomie. Auch bei Zufuhr von Glukose mit Cholsäure fiel der Glykogengehalt der Leber der vagotomierten Kaninchen etwas kleiner als der der normalen aus. Er betrug durchschnittlich 0.458%. Es wird im Vergleich mit dem normalen Kaninchen die Glykogenbildung der Leber der vagotomierten Kaninchen bei Zufuhr von Glukose um 33.3%, bei der von Glukose mit Cholsäure um 18.2% herabgesetzt. Doch wird auch hier die Glykogenbildung der Leber beim vagotomierten Kaninchen durch Zufuhr von Cholsäure gefördert. Diese die Glykogenbildung fördernde Wirkung der Cholsäure tritt beim vagotomierten Kaninchen viel deutlicher als beim splanchnikotomierten auf. Beim vagotomierten Kaninchen wird die Glykogenbildung der Leber durch die Zufuhr von Cholsäure um 41.96% gesteigert, während sie beim splanchnikotomierten dadurch nur um 6.4% zunimmt.

Aus den obigen Resultaten geht hervor, dass bei der Leber die

Tabelle IV. (Vagotomie)

A.

Nr.	Körpergewicht vor dem Hungern	Körpergewicht nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	Glykogen (%)	Bemerkungen
1	2200	1800	42.4	0.344	Glukose 3 g pro kg
2	2200	1700	38.0	0.322	
3	2100	1600	29.5	0.312	
4	2100	1600	35.2	0.322	
5	2200	1800	40.5	0.312	
		Durchschnittswert		0.3224	

B.

Nr.	Körpergewicht vor dem Hungern	Körpergewicht nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	Glykogen (%)	Bemerkungen
1	2406	1700	37.2	0.333	Glukose 3 g Cholsäure 0.3 g
2	2100	1600	38.0	0.666	
3	2180	1800	42.5	0.434	
4	2200	2000	42.8	0.454	
5	2200	1600	28.7	0.333	
6	2300	2100	45.3	0.526	
		Durchschnittswert		0.458	

Glykogenbildung aus Glukose allein durch die Vagotomie stärker als durch die Splanchnikotomie herabgesetzt wird, während bei gleichzeitiger Zufuhr der Cholsäure das Umgekehrte der Fall ist. Diese Tatsache zeigt, dass die Glykogenbildung der Leber aus Glukose allein mit der Funktion des Vagus in innigerem Zusammenhang als mit der des Sympathicus steht, und dass sich bei gleichzeitiger Zufuhr von Cholsäure diese Verhältnisse bis zu einem gewissen Grade ausgleichen. Es wird nämlich die vagische Wirkung, durch die es zur Sekretion des assimilatorischen Hormons (Insulin) aus den Langerhansschen Inseln des Pankreas kommt, durch die Wirkung der Cholsäure bis zu einem gewissen Grade ersetzt. Die Ursache der durch Zufuhr von Cholsäure gesteigerten

Glykogenbildung der Leber vagotomierter Kaninchen ist wohl hauptsächlich in der die sympathischen Nerven der Leber lähmenden Wirkung der Cholsäure zu suchen. Die obigen Tatsachen deuten darauf hin, dass die die Glykogenbildung fördernde Wirkung der Cholsäure durch die Funktion der sympathischen Nerven mehr als durch die der vagischen beeinflusst wird.

Zusammenfassung.

1. Die Glykogenbildung der Leber wird durch Zufuhr von Cholsäure gefördert.

2. Durch Splanchnikotomie wird in der Leber die Glykogenbildung aus Glukose sowohl mit als auch ohne Cholsäure herabgesetzt.

3. Diese durch Splanchnikotomie herabgesetzte Glykogenbildung der Leber bei Zufuhr von Glukose ohne oder mit Cholsäure wird durch Zufuhr von Ergotamin wieder gesteigert. Daraus geht hervor, dass die durch Splanchnikotomie verursachte Herabsetzung der Glykogenbildung in der Leber durch das zwecks Gegenregulation zustandekommende Überfunktionieren der unversehrt gebliebenen sympathischen Nerven bedingt ist.

4. Durch Vagotomie wird in der Leber die Glykogenbildung aus Glukose sowohl mit als auch ohne Cholsäure herabgesetzt. Diese durch Vagotomie herabgesetzte Glykogenbildung tritt viel stärker bei Zufuhr von Glukose allein als bei der von Glukose mit Cholsäure auf. Dies zeigt, dass die vagische Wirkung hinsichtlich der Glykogenbildung der Leber durch die Wirkung der Cholsäure bis zu einem gewissen Grade vertreten wird.

5. Die Glykogenbildung aus Glukose in der Leber wird sowohl bei Splanchnikotomie als auch bei Vagotomie durch Zufuhr von Cholsäure gesteigert. Diese die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung der Cholsäure tritt bei Vagotomie viel stärker als bei Splanchnikotomie auf. Daraus geht hervor, dass die die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung der Cholsäure mit der Funktion des vegetativen Nervensystems in innigem Zusammenhang steht, und zwar so, dass sie vom sympathischen mehr als vom vagischen System abhängt.

LITERATUR.

Aschner, B. (1912): Pflügers Arch., **146**, 1.
Barre, La J. (1927): Arch. intern. physiol., **29**, 227.
Barre, La J. (1927): C. r. soc. Biol. Paris, **96**, 193.
Barre, La J. u. Destrée, P. (1929): C. r. soc. Biol. Paris, **99**, 1874.
Brugsch, Th., Dressel, K. u. Lewy, F. H. (1920/21): Schmiedbergs Arch., **21**, 358, u. **25**, 262.
Cori, C. E. u. Cori, G. T. (1927): Biochem. Zeitschr., **206**, 45.
Cannon, W. B. u. Smith, P. E. (1922): Amer. Jl. Physiol., **60**, 476.
Camus, J., Gournay, J. J. u. Grand (1925); Presse Méd. 1925, Jg., s. 249.
Chikamori, S. (1930): Okayama Igakkai Zasshi, 1930. Jg., s. 1963.
„ „ 1931. Jg., s. 1946.
Dresel, K. (1923): Zeitschr. f. exper. Med., **37**, 373.
Dresel, K. u. Lewy, F. H. (1922): Zeitschr. f. exper. Med., **26**, 95.
Fuzita, S. (1930): Jl. of Bioch., **12**, 383.
„ (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 151.
Kaziro, K. u. Taku, A. (1929): Jl. of Bioch., **11**, 203.
Lombroso, U. (1931): Zitiert von Isaac u. Siegel, Handb. d. norm. u. path. Physiol., **16**, II. 1706.
Misaki, K. (1927): Jl. of Bioch., 8, 235.
Okamura, S. (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 165.
„ (1931): „ **2**, 505.
Pollak, L. (1909): Arch. f. exper. Path., **61**, 149.
Rupp, F. (1925): Zeitschr. f. exper. Med., **44**, 476.
Sachs, E. u. Macdonald, M. E. (1925): Arch. of Neurol., **13**, 335.
Siegel, R. (1929: Klin. Wschr., 1929. Jg., s. 1069.
Sekito, T. (1900): Jl. of Bioch., **11**, 391, u. **12**, 59.
Schulze, O. (1900): Schmiedbergs-Arch., **43**, 204.
Tsuji, K. (1930): Jl. of Bioch., **12**, 139.
Taku, A. (1930): Jl. of Bioch., **12**, 371.
„ (1931): „ **13**, 237.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL. XIII.

Glykogenbildung der Leber durch Gallensäure und innersecretorische Hormone.

Von

KANZI FUZIWARA.

(*Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama. Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.*)

(Eingegangen am 19. Oktober 1931)

Es ist bekannt, dass die Leber im Kohlehydratstoffwechsel eine zentrale Stellung einnimmt, indem sie die dem Körper zufliessende Kohlehydratmenge reguliert, und, wenn solche in der Nahrung fehlt, aus anderen Materialien Zucker herstellt. Der Kohlehydratstoffwechsel wird also in der Leber reguliert d.h. der Glykogenaufbau und Glykogenabbau wird sowohl durch das vegetative Nervensystem als auch durch die chemische Wirkung der Hormone, wie Adrenalin, Thyroxin und Insulin beeinflusst, die alle mit der Funktion des vegetativen Nervensystems innig zusammenhängen. Soweit die Insulinwirkung heute erklärbar ist, besteht das Wesen derselben in der Beschleunigung sowohl von Zuckerverbrennung als auch von Glykogenbildung, wie von Cori und Pucher (1923) und Satoh (1929) bewiesen wurde. Wird also das Insulin zusammen mit Glukose dem Tier eingespritzt, so wird die Glykogenbildung der Leber gefördert, wie schon Noorden und Isaac (1924), Bissinger und Lesser (1926) und Nakamura (1926) beobachtet haben. Nach Satoh(l. c.) tritt die Glykogenbildung auch bei hungernden Tieren auf, wenn man wiederholt Insulin in kleiner Menge zuführt.

Was die Wirkung des Adrenalins anbetrifft, so wurde durch die Untersuchungen von Pollak (1909), Ohara (1925), Abelin, Goldener u. Kobori(1926) und Cori und Cori(1929) gefunden, dass das Adrenalin nicht nur auf das Glykogen mobilisierend wirkt, sondern auch in minimalen Mengen ein Aufbauhormon des Leber-

glykogens ist, und dass sogar die wiederholte Injektion grosser Dosen von Adrenalin selbst bei hungernden Tieren glykogenbildend wirkt. Es ist bereits wohl bekannt, dass der Kohlehydratstoffwechsel beziehungsweise der Glykogenaufbau und Glykogenabbau neben diesen Hormonen auch durch das vegetative Nervensystem reguliert wird. Nach Macleod (1923) und Hoshi (1926) wird die Insulinsekretion des Pankreas vom N. Vagus allein beherrscht, weil die Menge des Pankreashormons im Blut des Kaninchens unabhängig von der Splanchnikotomie ist, und zwar wird sie nach Macleod vom rechten Vagus kontrolliert. Nach Macleod und Pearce (1912) und Dresel (1924) soll der Zuckerstich, der durch Abbau von Glykogen in der Leber Hyperglykämie und Glykosurie herbeiführt, entweder unter Vermittelung des Adrenalins von der Nebenniere aus auf die Leber oder unter Vermittelung der N. Splanchnici direkt auf die Leber einwirken. Uns scheint es höchst wahrscheinlich, dass der Zuckerstich unter Vermittelung der N. Splanchnici direkt auf die Glykogenolyse der Leber einwirkt und dadurch Hyperglykämie und Glykosurie verursachen kann, weil nach Miki (1931) das Adrenalin durch Splanchnicusdurchschneidung beim Kaninchen glykogenbildend wirkt.

Seit Mehring ist bekannt, dass Phlorizin stark glykosurisch und auf das Glykogen der Leber mobilisierend wirkt, und nach Rosenfeld (1907) kann während des Hungerzustandes bei Phlorizintieren das Glykogen vollständig verschwinden. Durch die Untersuchungen von Misaki (1927), Fuzita (1930, 1931), Sekitoo (1929, 1930), Okamura (1930) und Chikamori (1930) wurde bewiesen, dass die Gallensäure die Glykogenbildung in der Leber von Kaninchen fördert und dass sie nach Sekitoo auf das Phlorizin, nach Misaki, Taku (1929, 1930), Okamura (1928) und Murakami (1928) auf das Adrenalin antagonistisch wirkt, indem in ersterem Fall die Gallensäure die Glykogenbildung der Leber bei Zufuhr von Phlorizin fördert und in letzterem Fall die hyperglykämische Wirkung und die Glykosurie des Adrenalins hemmt. Nach Tsuji (1930), Kaziro (1930), Taku (1930, 1931) und Sekitoo (1930) soll die Gallensäurewirkung mit der Funktion des vegetativen Nervensystems in innigem Zusammenhang stehen,

indem die Gallensäure auf den Sympathicus lähmend und auf den Vagus reizend wirkt. Also hat die Gallensäure eine hormonale Wirkung. In diesem Sinne ist es interessant, das Verhalten der Gallensäure bei der Glykogenbildung der Leber gegenüber den innersekretorischen Hormonen und dem glykogenmobilisierenden Gift Phlorizin zu studieren, welche ersteren mit der Funktion des vegetativen Nervensystems innig verknüpft sind und auf den Kohlehydratstoffwechsel starken Einfluss ausüben können.

Experimenteller Teil.

Zum Versuch wurden kräftige Kaninchen verwendet, die vorher lange Zeit mit bestimmter Nahrung gefüttert worden waren. Die Kaninchen wurden zuerst 4 Tage lang in Hunger gehalten und als Kontrolltiere zum Versuch verwendet. Als Kontrolle wurden nach 4 tägigem Hunger nur 3 ccm einer 50%igen Glukoselösung pro kg Körpergewicht intravenös den Kaninchen verabreicht. Beim eigentlichen Versuch wurden den Kaninchen nach 4 Tagen Hunger als erste Gruppe 3 ccm einer 50%igen Glukoselösung intravenös und 3 ccm einer 1%igen Cholatlösung pro kg Körpergewicht subcutan gegeben.

Als 2te Gruppe wurden denselben Kaninchen 3 ccm derselben Glukoselösung intravenös und $\frac{2}{3}$ E. von Insulin subcutan oder $\frac{2}{3}$ E. von Insulin mit 3 ccm einer 1%igen Cholatlösung pro kg Körpergewicht, beide subcutan, verabreicht.

Als 3te Gruppe wurden den Kaninchen nach 4 Tagen Hunger 3 ccm derselben Glukoselösung intravenös und 0.3 ccm einer 0.1%igen Adrenalinchloridlösung mit oder ohne 3 ccm derselben Cholatlösung pro kg Körpergewicht subcutan gegeben.

Als letzte Gruppe wurden den hungernden Kaninchen 3 ccm derselben Glukoselösung intravenös und 0.2 g Phlorizin, in 10 ccm einer 5%igen Sodalösung gelöst, mit oder ohne 3 ccm derselben Cholatlösung pro kg Körpergewicht subcutan verabreicht.

Alle diese behandelten Tiere wurden 4 Stunden nach Zufuhr der Glukoselösung unter Verblutung getötet. Die schnell herausgeholte Leber wurde zuerst abgewogen, und dann ihr Glykogen-

gehalt nach der Methode von Iwasaki und Mori (1926) und Bertrand bestimmt.

1. Versuch bei Zufuhr von Glukose oder bei Hunger.

Hierbei wurde der Glykogengehalt der Leber von Kaninchen nach 4 Tagen Hunger und dann bei intravenöser Zufuhr von Glukose bestimmt.

Aus der Tabelle I A u. B ist ersichtlich, dass der Glykogen-

Tabelle I. (A).
Versuch bei Hunger.

Datum	Nr. des Kaninchens	Hunger in Tagen	Körpergewicht in g vor u. nach dem Hunger		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung
(1931)							
5/I	1	4	2770	2400	45.5	0.2383	
„	2	„	2460	2170	43.0	0.5928	
7/I	3	„	2350	2020	40.8	0.2892	
„	4	„	2010	1780	35.6	0.3874	
„	5	„	2260	1890	34.9	0.6798	
9/I	6	„	2376	2040	38.1	0.2638	
„	7	„	1900	1540	31.6	0.3902	
„	8	„	1890	1560	34.2	0.4017	
Durchschnittswert						0.4054	

Tabelle I. (B).
Versuch bei Zufuhr von Glukose.

Datum	Nr. des Kaninchens	Hunger in Tagen	Körpergewicht in g vor u. nach dem Hunger		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung
11/I	1	4	2280	2100	46.0	1.4510	3 ccm 50 % Glukoselösung pro Kilo.
„	2	„	2110	1800	52.0	1.5851	
„	3	„	2200	1790	41.7	1.6312	
14/I	4	„	1930	1550	32.4	0.7460	
„	5	„	1960	1696	34.0	1.4394	
„	6	„	1800	1500	35.2	1.6520	
17/I	7	„	1920	1660	35.0	0.9982	
„	8	„	2210	1970	42.0	0.7500	
„	9	„	2030	1720	31.0	1.0761	
19/I	10	„	2000	1690	35.0	1.3995	
„	11	„	1880	1510	31,8	1.6103	
Durchschnittswert						1.3035	

gehalt der Leber nach 4 Tagen Hunger durchschnittlich 0.4054% beträgt und bei Zufuhr von Glukose 1.3035%. Also wird die Glykogenbildung der Leber der 4 Tage lang hungernden Kaninchen durch Zufuhr von Glukose um 221.53% gesteigert.

2. *Versuch bei parenteraler Zufuhr von Glukose mit Cholsäure.*

Bei diesem Versuch wurde den hungernden Kaninchen bald nach intravenöser Zufuhr von Glukose die Cholatlösung subcutan injiziert und nach weiteren 4 Stunden der Glykogengehalt der Leber bestimmt. In der Tabelle II zeigt sich, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Glukose mit Cholsäure durchschnittlich mit 1.5561% angegeben wird. Aus dem Ergebnis folgt, dass die Glykogenbildung in der Leber durch die parenterale Zufuhr von Cholsäure mit Glukose verglichen mit der bei Zufuhr von Glukose allein durchschnittlich um 19.38% gesteigert wird. Nach der Untersuchung von Fuzita (1930) soll die Glykogenbildung der Leber durch perorale Zufuhr von Glukose mit Chol-

Tabelle II.

Versuch bei Zufuhr von Glukose mit Cholsäure.

Datum	Nr. des Kaninchens	Hunger in Tagen	Körpergewicht in g vor u. nach dem Hunger		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung
26/I	1	4	1900	1680	34.3	1.8819	3 ccm 50% Glukoselösung und 3 ccm 1% Na-Cholatlösung pro Kilo.
„	2	„	2600	2200	42.3	1.1230	
„	3	„	2050	1800	32.0	1.8462	
28/I	4	„	1990	1620	35.4	0.9719	
„	5	„	2100	1840	37.1	1.5655	
2/II	6	„	2750	2330	44.6	1.9772	
„	7	„	2550	2315	45.4	1.4971	
„	8	„	1930	1585	40.0	0.8921	
4/II	9	„	2090	1820	37.3	0.9196	
„	10	„	1600	1310	33.0	1.3522	
„	11	„	1480	1240	31.0	2.9911	
Durchschnittswert						1.5561	

säure im Vergleich mit der von Glukose allein durchschnittlich um 49.7% gesteigert werden. Also tritt die die Glykogenbildung fördernde Wirkung der Cholsäure bei ihrer parenteraler Zufuhr viel schwächer auf als bei der peroralen. Das scheint mir darauf zu beruhen, dass die parenteral zugeführte Cholsäure nicht restlos in die Leber gelangen kann, sondern zum Teil als solche im Harn ausgeschieden wird, wie schon von Fuziwara (1930) beim Kaninchen bewiesen wurde.

3. Versuch bei parenteraler Zufuhr von Glukose und Insulin mit oder ohne Cholsäure.

Hier wurde den hungernden Kaninchen bald nach intravenöser Zufuhr von Glukoselösung Insulin, ohne oder mit Cholsäure, subcutan injiziert und nach weiteren 4 Stunden der Glykogengehalt der Lebern einzeln bestimmt.

Die Tabellen III A und III B zeigen, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Glukose mit Insulin durchschnittlich 1.5557% beträgt, während er bei Zufuhr von Glukose und Insulin

Tabelle III. (A).
Versuch bei Zufuhr von Glukose mit Insulin.

Datum	Nr. des Kaninchens	Hunger in Tagen	Körpergewicht in g vor u. nach dem Hunger		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung
8/II	1	4	2226	1900	40.0	1.9312	3 ccm 50 % Glukoselösung und $\frac{2}{3}$ E. Insulin pro Kilo.
„	2	„	1670	1290	34.6	1.6777	
10/II	3	„	1860	1560	29.8	1.4340	
„	4	„	1980	1670	37.2	1.5033	
12/II	5	„	1970	1675	31.3	1.3623	
„	6	„	1740	1360	36.4	1.1744	
14/II	7	„	1830	1600	38.0	1.4930	
„	8	„	1890	1540	37.5	1.3038	
16/II	9	„	1800	1550	36.8	2.2976	
„	10	„	1470	1250	34.5	0.9614	
„	11	„	2300	1950	41.0	1.9738	
Durchschnittswert						1.5557	

Tabelle III. (B).

Versuch bei Zufuhr von Glukose mit Insulin und Cholsäure.

Datum	Nr. des Kaninchens	Hunger in Tagen	Körpergewicht in g vor u. nach dem Hunger		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung
20/II	1	4	1780	1450	27.4	1.0128	3 ccm 50 % Glukoselösung und $\frac{2}{3}$ E. Insulin mit 3 ccm 1 % Na-Cholatlösung pro Kilo.
„	2	„	1900	1680	42.5	0.9701	
22/II	3	„	1710	1460	35.5	1.6274	
„	4	„	1690	1380	30.0	2.0147	
24/II	5	„	2400	2160	42.0	1.7039	
„	6	„	1860	1560	40.0	1.2746	
27/II	7	„	1910	1680	31.0	2.9669	
„	8	„	1710	1450	30.0	1.5759	
1/III	9	„	1850	1570	29.5	1.4744	
Durchschnittswert						1.6245	

mit Cholsäure durchschnittlich als 1.6245% gefunden wird. Also fördert das Insulin bei Zufuhr von Glukose die Glykogenbildung der Leber, und die Glykogenbildung der Leber wird im Vergleich mit der bei Zufuhr von Glukose allein durch das Insulin durchschnittlich um 19.34% gesteigert und zwar genau in gleichem Grade durch Cholsäure. (Vergleich der Tabelle II mit III A.)

Durch die Zufuhr von Glukose und Insulin mit Cholsäure wird die Glykogenbildung der Leber verglichen mit der bei Zufuhr von Glukose allein durchschnittlich um 24.62% gesteigert. Also fördert die Cholsäure die Glykogenbildung der Leber genau wie das Insulin, wenn sie parenteral eingeführt wird. Diese die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung des Insulins wird durch parenterale Zufuhr von Cholsäure weiter gesteigert.

Auf die Glykogenbildung der Leber wirkt also die Cholsäure mit Insulin synergistisch.

4. Versuch bei Zufuhr von Glukose und Adrenalin mit oder ohne Cholsäure.

Auch hier wurde den hungernden Kaninchen bald nach der parenteralen Zufuhr von Glukoselösung das Adrenalin ohne oder

mit Cholsäure subcutan verabreicht und nach weiteren 4 Stunden der Glykogengehalt der Lebern einzeln untersucht. Aus der Tabelle IV A u. B lässt sich ersehen, dass der Glykogengehalt der Leber bei parenteraler Zufuhr von Glukose und Adrenalin durchschnittlich mit 0.669% und bei der von Glukose und Adrenalin mit Cholsäure mit 0.9527% angegeben wird. Es wird nämlich die Glykogenbildung der Leber bei Zufuhr von Adrenalin im Vergleich mit der bei Zufuhr von Glukose allein durchschnittlich um 48.67% herabgesetzt, während sie bei Zufuhr von Adrenalin mit Cholsäure durchschnittlich um 26.91% herabgesetzt wird. Natürlich wird die Glykogenbildung der Leber sowohl bei Zufuhr von Adrenalin als auch bei der von Adrenalin und Cholsäure, verglichen mit der bei Hunger, stark gesteigert. (Vergleich mit der Tabelle I A u. B.)

Also fördert doch die Cholsäure die Glykogenbildung in der Leber bei Zufuhr von Adrenalin, das bekanntlich das Glykogen der Leber mobilisiert.

Aus den Tatsachen geht hervor, dass die Cholsäure die das Glykogen mobilisierende Wirkung des Adrenalins hemmt.

Tabelle IV. (A).
Versuch bei Zufuhr von Glukose mit Adrenalin.

Datum	Nr. des Kaninchens	Hunger in Tagen	Körpergewicht in g vor u. nach dem Hunger		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung
3/III	1	4	1849	1590	44.0	0.6558	3 ccm 50% Glukoselösung und 0.3 ccm 0.1% Adrenalin-Chloridlösung pro Kilo.
„	2	„	1870	162)	43.0	0.7879	
5/III	3	„	1972	1480	29.1	0.7462	
8/III	4	„	1780	1300	27.8	0.4758	
„	5	„	1810	1560	39.7	0.8801	
10/III	6	„	1800	1330	25.0	0.5636	
„	7	„	2040	1620	40.7	0.4295	
13/III	8	„	1870	1490	45.5	0.8464	
„	9	„	2080	1420	37.4	0.6631	
15/III	10	„	1850	1510	26.0	0.7588	
„	11	„	1790	1400	28.0	0.5518	
Durchschnittswert						0.6690	

Tabelle IV. (B).

Versuch bei Zufuhr von Glukose mit Adrenalin und Cholsäure.

Datum	Nr. des Kaninchens	Hunger in Tagen	Körpergewicht in g vor u. nach dem Hunger		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung
22/III	1	4	2050	1700	43.5	0.6575	3 ccm 50 % Glukoselösung, 0,3 ccm 0.1 % Adrenalinchloridlösung und 3 ccm 1 % Na-Cholatlösung pro Kilo.
„	2	„	1980	1650	42.0	1.4986	
25/III	3	„	2000	1640	37.5	0.7444	
„	4	„	1550	1340	37.6	0.6180	
27/III	5	„	1600	1380	32.3	1.0197	
„	6	„	1650	1290	32.0	1.5013	
29/III	7	„	1710	1500	32.6	0.6083	
„	8	„	1670	1654	31.8	0.9514	
31/III	9	„	1880	1560	36.5	0.8980	
„	10	„	2110	1800	38.0	1.0245	
Durchschnittswert						0.9527	

5. Versuch bei Zufuhr von Glukose und Phlorizin ohne oder mit Cholsäure.

Bei diesem Versuch wurde den hungernden Kaninchen bald nach parenteraler Zufuhr von Glukose das Phlorizin, in 5%iger Sodalösung gelöst, mit oder ohne Cholsäure, subcutan verabreicht.

Die Tabelle V A u. B zeigt, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Glukose und Phlorizin durchschnittlich 0.3884% und bei der von Glukose und Phlorizin mit Cholsäure 0.5768% beträgt. Verglichen mit der bei Zufuhr von Glukose allein wird die Glykogenbildung der Leber durch Zufuhr von Phlorizin durchschnittlich um 70.20% und durch die von Phlorizin mit Cholsäure um 55.75% herabgesetzt. Diese herabgesetzte Glykogenbildung in der Leber tritt viel stärker auf als bei Zufuhr von Adrenalin. Doch fördert die Cholsäure die Glykogenbildung der Leber, auch wenn das stark glykogenmobilisierend wirkende Phlorizin mitzugeführt wird. Also wirkt die Cholsäure, was die Glykogenbildung der Leber anbetrifft, auf das Phlorizin antagonistisch, wie von Sekitoo (1930) bereits nachgewiesen wurde.

Tabelle V. (A).
Versuch bei Zufuhr von Glukose mit Phlorizin.

Datum	Nr. des Kaninchens	Hunger in Tagen	Körpergewicht in g vor u. nach dem Hunger		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung
4/IV	1	4	2010	1700	31.0	0.2877	3 ccm 50 % Glukoselösung und 0.2 g Phlorizin pro Kilo.
„	2	„	1930	1620	33.0	0.5893	
6/IV	3	„	2050	1750	29.8	0.2688	
„	4	„	2230	1896	34.2	0.3069	
8/IV	5	„	1860	1670	37.6	0.4102	
„	6	„	1885	1570	34.8	0.3790	
11/IV	7	„	2010	1740	25.2	0.3865	
„	8	„	1900	1590	30.8	0.5275	
13/IV	9	„	2000	1760	33.7	0.3395	
„	10	„	2140	1700	29.8	0.3090	
„	11	„	1960	1650	34.5	0.4673	
Durchschnittswert						0.3884	

Tabelle V. (B).
Versuch bei Zufuhr von Glukose mit Phlorizin und Cholsäure.

Datum	Nr. des Kaninchens	Hunger in Tagen	Körpergewicht in g vor u. nach dem Hunger		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung
3/V	1	4	2040	1850	36.5	0.6865	3 ccm 50 % Glukoselösung, 0.2 g Phlorizin und 3 ccm 1 % Cholatlösung pro Kilo.
„	2	„	2190	1790	29.8	0.3743	
5/V	3	„	1730	1575	33.1	0.3764	
„	4	„	2050	1720	36.7	0.5459	
7/V	5	„	1960	1610	34.0	0.7671	
8/V	6	„	1860	1595	28.0	0.4758	
„	7	„	1930	1580	31.5	0.5293	
10/V	8	„	1880	1540	34.3	0.4470	
„	9	„	2000	1710	29.5	0.5371	
12/V	10	„	2125	1840	31.6	0.7117	
„	11	„	2200	1910	28.4	0.8938	
Durchschnittswert						0.5768	

Zusammenfassung.

1. Die Glykogenbildung der Leber von hungernden Kaninchen wird durch Zufuhr von Cholsäure gefördert, auch wenn diese zusammen mit Glukose parenteral zugeführt wird.

2. Das Insulin fördert die Glykogenbildung der Leber von hungernden Kaninchen bei parenteraler Zufuhr der Glukose, und diese Wirkung des Insulins wird durch weitere parenterale Zufuhr von Cholsäure verstärkt.

3. Unter parenteraler Zufuhr von Glukose wird die Glykogenbildung der Leber von hungernden Kaninchen durch Adrenalin herabgesetzt und durch weitere parenterale Zufuhr von Cholsäure wieder gefördert.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Cholsäure bei der Glykogenbildung der Leber von hungernden Kaninchen zu der glykogenolytischen Wirkung des Adrenalins antagonistisch und zu der glykogenietischen Wirkung des Insulins synergistisch wirkt, indem sie alle zusammen die Glykogenbildung und Glykogenspaltung der Leber regulieren.

4. Die Glykogenbildung der Leber von hungernden Kaninchen wird unter parenteraler Zufuhr von Glukose durch Phlorizin gehemmt und durch die weitere parenterale Zufuhr von Cholsäure wieder verstärkt. Diese Tatsachen zeigen, dass die Cholsäure die glykogenolytische Wirkung des Phlorizins hemmt, wie von Sekitoo beobachtet wurde.

LITERATUR.

Abelin, T., Goldener, E. u. Kobori, B. (1926): Biochem. Zeitschr. **174**, 232.

Bissinger, E. u. Lesser, E. J. (1926): Biochem. Zeitschr., **168**, 398.

Cori, C. F., Cori, G. T. u. Pucher (1923): Journ. of Pharmakol., **21**, 377.

Cori, C. F. u. Cori, G. T. (1929): Biochem. Zeitschr., **206**, 45.

Chikamori, S. (1930): Okayama Igakkai Zasshi, 1930 Jg. S. 1963.

Chikamori, S. (1931): ebenda, 1931 Jg. S. 1946.

Fuzita, S. (1930): Journ. of Biochem., **12**, 383.

Fuzita, S. (1931): ebenda, **13**, 219.

Fuzita, S. (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 151.

Fujiwara, K. (1931): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 291.
Iwasaki, K. u. Mori, M., Praxis physiol. chem. Kursus von Suto, XI. Auflage, S. 334.
Kaziro, K. u. Taku, A., (1930): Journ. of Biochem., **12**, 139.
Misaki, K. (1927): ebenda, **8**, 235.
Murakami, K. (1928): Journ. of Biochem., **9**, 261.
Miki, T. (1931): Journ. of Biochem., **15**, 167.
Noorden, C. v. und Isaac, S. (1924): Klin. Wschr., 1924 Jg. S. 721.
Nakamura, K. (1926): Nippon Naikagaku Zasshi, **13**, 279.
Ohara, T. (1925): Tohoku Journ. Exper. Med., **6**, 1.
Okamura, S. (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 165.
Okamura, S. (1931): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 471 u. 505.
Okamura, T. (1928): Journ. of Biochem., **9**, 271.
Pollak, L. (1909): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **61**, 149.
Rosenfeld, G. (1909): Berliner klin. Wschr., 1909 Jg. S. 569.
Satoh, H. (1929): Tohoku Journ. Exper. Med., **13**, 6.
Sekitoo, T. (1929, 1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **1**, 183.
Sekitoo, T. (1930): Journ. of Biochem., **12**, 59.
Taku, A. (1929, 1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **1**, 413.
Tsuji, K. (1930): Journ. of Biochem., **12**, 139.
Taku, A. (1930): Journ. of Biochem., **12**, 371.
Taku, A. (1931): Journ. of Biochem., **13**, 237.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

ÜBER DIE GALLENSÄUREBILDUNG. (V).

Über den Einfluss der Nahrung auf den Gallensäuregehalt der Galle.

Von

TAKAHIKO FUKASE und KANZI FUZIWARA.

(*Aus dem physiologisch-chemischen Insitut Okayama. Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.*)

(Eingegangen am 19. Oktober 1931)

Higashi hat 1930 gefunden, dass die Gallensäure in der Galle des Hundes durch Verfütterung von Ergosterin, sei es vor oder nach Bestrahlung des Ergoterin mit ultravioletten Strahlen, gesteigert wird. Weiter hat er (1931) das getrocknete Okara aus Sojabonen analysiert und aus dem unverseifbaren Teil einige Sterine isoliert. Nach seinen Angaben fördert die perorale Zufuhr der unverseifbaren Teile von Okara, die die Tortelli-Jaffesche Reaktion geben, in Chloroform löslich, aber in Methylalkohol unlöslich sind, die Gallensäureausscheidung in der Galle des Hundes.

Diese gesteigerte Gallensäureausscheidung tritt stärker auf am nächsten Tag nach der Fütterung mit durch Ultraviolettstrahlen bestrahltem Okara.

Aus seinen Ergebnissen hat Higashi den Schluss gezogen, dass im getrockneten Okara die zur Gallensäurebildung dienenden Muttersubstanzen enthalten sind, die wahrscheinlich zu den Sterinen der Ergosterinreihe gehören.

Es steht fest, dass zwischen Gallensäureausscheidung und Nahrungsaufnahme eine bestimmte Beziehung besteht, und dass ferner die Art der Nahrung von Einfluss ist, wie Winogradow (1924, 1929), Sugano (1927) und Smith, Whipple und Groth (1928) in ihren Versuchen bewiesen haben.

Die Beweisführung für den Einfluss der Nahrung auf die Gallensäureausscheidung beruht ganz auf der indirekten Methode

der Gallensäurebestimmung. Nuerdings haben S. Okamura und T. Okamura (1930) gefunden, dass die Gallensäure der Kaninchengalle hauptsächlich aus Desoxycholsäure besteht. Danach hat Sekitoo (1931) aus der Kaninchengalle Glykocholeinsäure isoliert.

Um nun einerseits zu sehen, ob die Art der Gallensäure in der Galle von der Verschiedenheit der Nahrung abhängig ist, und andererseits wie der Gallensäuregehalt der Galle dadurch beeinflusst wird, wurden zwei Gruppen von Kaninchen mit voneinander verschiedener Nahrung lange Zeit im Sommer gezüchtet, und die Gallensäure in den Gallen derselben nach der Methode von Sekitoo (1931) isoliert und gewogen. Die eine Gruppe von 96 Kaninchen wurde 35 Tage lang mit frischen, grünen Kräutern Klee, und die andere Gruppe von 145 Kaninchen 45 Tage mit Okara gefüttert.

Die beiden Gruppen von Kaninchen wurden getötet, und die Gallensäure in den Gallen der beiden Gruppen getrennt untersucht. In den Gallen von beiden Gruppen von Kaninchen wurde dieselbe Gallensäure, die Glykocholeinsäure von Sekitoo (l. c.), gefunden. In den Gallen der mit Kräutern gefütterten Kaninchen ist die Glykocholeinsäure zu 2.34% enthalten; in den Gallen der mit Okara gefütterten Kaninchen zu 12.89%. Somit ist bewiesen, dass die Gallensäure in der Kaninchengalle qualitativ nicht verschieden ist, ob die Kaninchen nun mit Kräutern oder mit Okara gefüttert wurden, und dass der Gehalt an Gallensäure aber quantitativ je nach der Art der Nahrung grosse Unterschiede aufweist.

Aus diesen Tatsachen kann man wohl den Schluss ziehen, dass die Muttersubstanz für die Gallensäurebildung im Okara viel reichlicher enthalten ist, als in grünen Kräutern.

Beschreibung der Versuche.

1. Versuch mit grünen Kräutern.
(von Fukase ausgeführt).

96 Kaninchen wurde 35 Tage lang von Juni bis Juli 1930 mit frischen Kräutern (Klee) gefüttert, unter Verblutung getötet und die Gallenblasen derselben einzeln herausgeholt. Die gesamte

Menge der Galle betrug ca. 60 ccm. Nach der Entfernung des Mucins durch Alkohol wurde die Galle im Wasserbade von Alkohol befreit und durch Zusatz von Wasser bis zum ursprünglichen Volumen wieder aufgefüllt. Der durch fraktionierte Aussalzung mit Kochsalz erhaltene Niederschlag wurde wieder in Wasser gelöst und mit einer 10%igen Eisenchloridlösung ausgefällt, bis keine Fällung mehr entstand. Die Fällung wurde abfiltriert, getrocknet, wieder in Kalilauge gelöst und abfiltriert.

Das Filtrat wurde dann mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, abfiltriert, und der Niederschlag unter Entfärbung mit Tierkohle aus verdünntem Alkohol wiederholt umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 1.4 g. Die Säure kristallisiert in prismatischen Nadeln und schmilzt bei 183°–184°C.

Die spezifische Drehung im 1.5%iger alkoholischer Lösung zeigt $[\alpha]_D^{20} = +53.0$.

Nach wiederholter Umkristallisation aus verdünntem Alkohol und nach langem Trocken im Exsiccator schmilzt der Kristall bei 185°–186°C.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Sekitoo überein. Die erhaltene Gallensäure ist Glykocholeinsäure und Glykodesoxycholsäure.

2. *Versuch mit Okara aus Sojabohnen.* (*von Fuziwara ausgeführt*).

Diesmal wurden 145 Kaninchen 45 Tage lang von Juli bis September mit Okara gefüttert. Die erhaltene gesamte Galle der 145 Kaninchen betrug 190 ccm. Die nach Mucinbefreiung und durch Aussalzung in der gleichen Weise wie oben erhaltene kristallisierte Gallensäure aus 190 ccm Galle betrug insgesamt 24.53 g. Diese Säure kristallisiert auch in langen prismatischen Nadeln und schmilzt bei 184°C.

Die spezifische Drehung in 1%iger alkoholischer Lösung zeigt $[\alpha]_D^{20} = +54.0$.

Aus den Resultaten ergibt sich, dass die erhaltene Gallensäure Glykocholeinsäure ist.

LITERATUR.

Higashi, S. (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **1**, 582.
Higashi, S. (1931): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 396.
Okamura, S. u. Okamura, T. (1930): Zeitschr. f. physiol. Chem., **188**, 11.
Sugano, D. (1927): Journ. of Biochem., **7**, 457.
Smith, H. P. and Whipple, G. H. (1928): Journ. biol. chem., **80**, 671.
Smith, H. P., Groth, A. H. and Whipple, G. H. (1928): Journ. biol. chem., **80**, 659.
Sekitoo, T. (1931): Zeitschr. f. physiol. Chem., **199**, 225.
Winogradow, A. P. (1924): Pflügers Arch., **205**, 590.
Winogradow, A. P. (1929): Chem. Zentralblatt, **49**, 499.

The Journal of Biochemistry, Vol. XV, No. 1.

ON THE PHYSICO-CHEMICAL DIFFERENCES BETWEEN α-, β- AND γ-HEMOGLOBINS.

(Second Report).

By

T. TADOKORO, M. ABE and K. YOSHIMURA.

(Received for publication, October 27, 1931)

In the first report, Tadokoro, Abe and Yoshimura (1931), the authors distinguished α-, β- and γ-hemoglobins in the blood of the same individual animal by the following physico-chemical properties of globin freed from hematin. In Globin obtained from oxyhemoglobin crystals were distinguished many isomers by the differences of their isoelectric point, i. e., pH value between 7,05–7,50. Among those isomers the more alkaline globin contains much sulphur, basic nitrogen, histidin and lysin nitrogen. The specific rotatory power of the more alkaline globin in HCl solution shows a higher value than that of the less alkaline. The same tendency is observed in the Pt content of $PtCl_4$-double salt of globin. These differences of globin isomers prove the following facts which are reported by Anson, Reichert and Brown (1909). Many years ago they stated that the crystal of hemoglobin exists in α-, β- and γ-forms and that the distribution of each kind is different with the individual animal. They also assumed the following points of Bohr's report (1929) that the oxygen capacity of hemoglobin can be discerned into four isomers as α-, β-, γ- and δ-forms. From the results described in the authors' first report, it may be supposed that the hemoglobin or its derivatives contain some isomers which are distinguishable by different properties of globins. Further, as was stated in the authors' first report, it may be supposed that these different isomers of hemoglobin or its derivatives have different physico-chemical properties, i. e. solubility, oxygen capacity, crystal form and also that the properties of globins differ in their rotatory power, elementary composition and amino acid content. So the authors separated out the following different

samples by their solubility from pure oxyhemoglobin crystals which were isolated as described in the first report: Oxyhemoglobin insoluble in water at 30°C (Tadokoro, Abe and Yoshimura, 1931); that soluble in water with difficulty (Anson, Reichert and Brown, 1909); and that soluble in cold water (Bohr, 1929). From these three kinds of oxyhemoglobins the authors isolated the pure globin by the same method that was described in the previous paper.

I. Nitrogen, Sulphur and ash content of globins.

The samples thus obtained were analyzed by the ordinary method and their sulphur content was analyzed by Denis-Benedict's method. The following numbers show the percentage of dry matter.

Table I.

Animal	Solubility of Oxyhemoglobin	Nitrogen	Sulphur	Ash
Castrated horse	Soluble with difficulty in cold water	13,2411	0,3497	0,7639
„	Soluble in cold water	16,6581	0,5920	0,1094
Mare, 13 years	Insoluble in 30°C water	16,6330	0,3453	0,1386
„	Soluble with difficulty in cold water	16,8664	0,3657	0,2640
„	Soluble in cold water	16,5006	0,3796	0,3561

II. The isoelectric point of globins.

The isoelectric point of globins was determined by Michaelis and Nakashima's method which is based on the principle of mutual precipitation of different colloidal solutions. The pH value at which the maximum precipitation takes place is the isoelectric point of the protein.

Mastix sol: Five gm. of mastix were dissolved in 100 cc. of 96% alcohol. Ten cc. of the solution were poured into 200 cc. of distilled water and filtered.

Protein solution: One-tenth gm of anhydrous protein was dissolved in 100 cc. of n/200 HCl solution.

A Colloidal mixture was prepared in the following way:

Mastix: Protein	Mastix sol	n/200 HCl	Protein solution	Water
	cc.	cc.	cc.	cc.
5 : 1	5	3	1	5
5 : 2	5	2	2	5
5 : 4	5	—	4	5

The water was mixed with the protein solution, n/200 HCl added and at last 5 cc. of mastix sol was added. The series of different hydrogen ion concentration was prepared as follows:—

	1	2	3	4	5	6	7
	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.
n/10 Na-acetate	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
n/100 NaOH	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Water	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,3
Colloid Mixture	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

The sign (—) indicates that no precipitation took place; (+) that the solution became turbid; (×) that precipitation took place; (× ×) that precipitation appeared in globe suspension and (× × ×) that precipitation formed itself and the liquid became clear.

TABLE II.

Castrated horse.

1. Soluble with difficulty in cold water.

Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	—	—	—	—
	30 m	+	×	+	—	—	—	—
	1 h	×	× ×	×	—	—	—	—
	5 h	× × ×	× ×	× × ×	+	—	—	—
	24 h	× × ×	× × ×	× × ×	+	—	—	—

5 : 2	10 m	+	+	+	+	–	–	–
	30 m	+	+	+	+	–	–	–
	1 h	×	×	×	+	–	–	–
	5 h	××	××	××	+	–	–	–
	24 h	×××	×××	×××	+	–	–	–
5 : 4	10 m	+	+	+	+	–	–	–
	30 m	+	×	+	+	–	–	–
	1 h	×	××	×	×	–	–	–
	5 h	×××	×××	×××	×	–	–	–
	24 h	×××	×××	×××	××	–	–	–

EMF 332 mv
pH 7,31

TABELLE III.

Castrated horse.

2. Soluble in cold water.

Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	–	–	–	–
	30 m	+	×	+	–	–	–	–
	1 h	××	××	×	–	–	–	–
	5 h	×××	××	×	–	–	–	–
	24 h	×××	×××	××	–	–	–	–
5 : 2	10 m	+	+	+	–	–	–	–
	30 m	×	×	×	–	–	–	–
	1 h	××	××	××	–	–	–	–
	5 h	×××	×××	×××	+	–	–	–
	24 h	×××	×××	×××	+	–	–	–
5 : 4	10 m	+	+	+	+	–	–	–
	30 m	+	+	×	+	–	–	–
	1 h	×	×	××	×	–	–	–
	5 h	×××	×××	×××	××	–	–	–
	24 h	×××	×××	×××	×××	+	–	–

EMF 234 mv
pH 7,46

TABELLE IV.
Mare, 13 years.

1. Insoluble in 30°C water.

Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	–	–	–	–
	30 m	×	×	+	–	–	–	–
	1 h	××	××	×	+	–	–	–
	5 h	×××	××	×	+	–	–	–
	24 h	×××	×××	×	+	–	–	–
5 : 2	10 m	+	+	+	–	–	–	–
	30 m	×	×	×	+	–	–	–
	1 h	××	××	×	+	–	–	–
	5 h	×××	×××	××	+	–	–	–
	24 h	×××	×××	××	+	–	–	–
5 : 4	10 m	+	+	+	+	–	–	–
	30 m	××	×	×	+	–	–	–
	1 h	××	××	××	×	–	–	–
	5 h	×××	×××	×××	×	–	–	–
	24 h	×××	×××	×××	×	–	–	–

EMF 498 mv
pH 7,01

TABLE V.
Mare, 13 years.

2. Soluble with difficulty in cold water.

Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	–	–	–	–
	30 m	×	×	×	–	–	–	–
	1 h	××	××	×	+	–	–	–
	5 h	×××	×××	××	+	–	–	–
	24 h	×××	×××	××	+	–	–	–
5 : 2	10 m	+	+	+	–	–	–	–
	30 m	×	×	×	+	–	–	–
	1 h	××	××	××	+	–	–	–
	5 h	×××	×××	×××	+	–	–	–
	24 h	×××	×××	×××	+	–	–	–

5 : 4	10 m	+	+	+	+	−	−	−
	30 m	×	××	×	+	−	−	−
	1 h	××	××	××	+	−	−	−
	5 h	×××	×××	×××	×	−	−	−
	24 h	×××	×××	×××	×	−	−	−

EMF 432 mv
pH 7,12

TABLE VI.
Mare, 13 years.

3. Soluble in cold water.

Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	+	−	−	−
	30 m	×	×	×	+	−	−	−
	1 h	××	××	××	+	−	−	−
	5 h	×××	×××	×××	+	−	−	−
	24 h	×××	×××	×××	×	−	−	−
5 : 2	10 m	+	+	+	+	−	−	−
	30 m	×	×	×	+	−	−	−
	1 h	××	××	××	×	−	−	−
	5 h	×××	×××	×××	×	−	−	−
	24 h	×××	×××	×××	××	−	−	−
5 : 4	10 m	+	+	+	+	+	−	−
	30 m	×	×	××	×	+	−	−
	1 h	××	××	××	×	+	−	−
	5 h	×××	×××	×××	××	+	−	−
	24 h	×××	×××	×××	××	+	−	−

EMF 410 mv
pH 7,16

III. THE SPECIFIC ROTATORY POWER OF GLOBINS.

The specific rotatory power of globin isomers which are obtained from oxyhemoglobin in different solubilities could be expected. The globin HCl solution was examined by means of a Haensch-Schmidt's three-shadow polariscope and the following results were obtained:

TABLE VII.

Animal	Solubilities of Oxyhemoglobin	$[\alpha]_D^{20}$	Ratio
Castrated horse	Soluble with difficulty in cold water	−77,844	89
„	Soluble in cold water	−87,425	100
Mare, 13 years	Insoluble in 30°C water	−65,870	66
	Soluble with difficulty in cold water	−74,850	75
	Soluble in cold water	−99,760	100

IV. Separation and determination of amino acids of globins.

A difference between the isomers with regard to the amino acid of the globins as to quantity and kind may be expected from the data of the above results which show that the structures of the globin molecules differ markedly. The authors determined their amino acid content by van Slyke's method as described in the previous paper and obtained the results shown in table VIII.

Conclusion.

From the following differences of physico-chemical properties of globin free from hematin, three isomers of hemoglobins in the blood of the same individual were distinguished.

1. From the pure crystals of oxyhemoglobin of the same individual animal, the following three isomers were distinguished by the their solubility; i.e. Tadokoro, Abe and Yoshimura (1931) the isomer soluble in cold water Anson, Reichert and Brown (1909) that soluble with difficulty in water and Bohr (1929) the oxyhemoglobin insoluble in 30° water.

2. These isomer of oxyhemoglobin distinguished according to their solubility can further be distinguished by the isoelectric point of the globins, i.e. pH value between 7,05–7,50. Among these isomers, the more alkaline globin is always more soluble than the less alkaline.

TABLE VIII.

Nitrogen	Castrated horse		Mare, 13 years		
	Soluble with difficulty in cold water	Soluble in cold water	Insoluble in 30° water	Soluble with difficulty in cold water	Soluble in cold water
Total N	16,2411	16,6581	16,9330	16,8634	16,5006
Amide N	1,2178	0,9467	0,9229	0,8468	0,9019
Melanin N(1)	0,3150	0,2037	0,2254	0,2788	0,2695
(2)	0,2415	0,2672	0,3005	0,2478	0,1970
Diamino N	4,9342	5,2188	5,9020	5,0599	6,0957
Monoamino N	9,3527	10,0188	9,2823	10,4331	9,0364
Arginin N	1,5118	1,5323	1,6526	0,5531	1,5136
Histidin N	2,2589	2,4589	3,4941	2,0884	3,8505
Cystin N	0,0747	0,0319	0,0699	0,0673	0,0738
Lysin N	1.0888	1,1658	0,6854	1,3511	0,6578
Total N	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Amide N	7,50	5,98	5,55	5,02	5,47
Melanin N(1)	1,94	1,24	1,35	1,65	1,63
(2)	1,47	1,60	1,81	1,47	1,19
Diamino N	30,38	31,33	35,48	30,00	36,94
Monoamino N	58,69	60,14	55,81	61,86	54,76
Arginin N	9,31	9,20	9,94	9,21	9,17
Histidin N	13,91	14,76	21,01	12,38	23,33
Cystin N	0,46	0,37	0,42	0,40	9,45
Lysin N	6,70	6,99	4,12	8,01	3'99

3. The more alkaline globin always shows a higher specific rotatory power and contains much sulphur, basic nitrogen, histidin and lysin nitrogen.

REFERENCES.

Anson, Reichert and Brown (1909): The crystallography of hemoglobins.

Bohr (1929): See Barcroft's "Die Atmungsfunktion des Blutes," II. Berlin.

Tadokoro, T., Abe, M. and Yoshimura, K. (1931): Journ. Biochem., Tokyo, 14, 145.